

Aus der Klinik für Nuklearmedizin der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. B. J. Krause

**$^{68}\text{Ga}$ -PSMA als Radiopharmakon für die Prostatakarzinom-Bildgebung:  
Vergleichende Untersuchung zur Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA durch LNCaP- und  
PC-3 Zellen in-vitro**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Philipp Cuber

Leipzig, im November 2019

Dekan: Prof. Dr. med. univ. E. C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. B. J. Krause  
Klinik für Nuklearmedizin  
Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. D.-C. Fischer  
AG Experimentelle Pädiatrie  
Klinik und Poliklinik Kinder- und Jugendmedizin  
Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. K. Herrmann  
Klinik für Nuklearmedizin  
Universitätsklinikum Essen

Datum der Einreichung: 27.12.2018

Datum der Verteidigung: 02.10.2019

<b>I.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>III.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung und Ziel der Arbeit</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Das Prostatakarzinom</b>	<b>4</b>
2.1	Epidemiologie des Prostatakarzinoms	4
2.2	Diagnostik des Prostatakarzinoms	6
2.3	Screening Untersuchungen zur Früherkennung des Prostatakarzinoms	7
2.4	Prostata-spezifisches Antigen (PSA)	7
2.5	Prostata-spezifisches Membran Antigen (PSMA)	7
2.6	Histopathologische Charakterisierung des Prostatakarzinoms	8
2.7	Grading und Staging des Prostatakarzinoms	8
2.8	Bildgebungsverfahren zur Diagnose des Prostatakarzinoms	10
2.8.1	Ultraschall	11
2.8.2	Skelettszintigrafie	11
2.8.3	MRT-Diagnostik	12
2.8.4	CT-Diagnostik	12
2.8.5	PET-Diagnostik und Tracer für den Einsatz beim Prostatakarzinom	12
2.8.5.1.	Einsatz von FDG in der PET-Bildgebung	15
2.8.5.2.	$^{18}\text{F}$ -Cholin / $^{11}\text{C}$ -Cholin	15
2.8.5.3.	$^{68}\text{Ga}$ -PSMA	15
2.8.5.3.1	Synthese von $^{68}\text{Ga}$ -PSMA	16
2.9	Therapie des Prostatakarzinoms	17
2.9.1	Active Surveillance / Watchful Waiting	17
2.9.2	Operative Verfahren	18
2.9.3	Systemische Therapie des Prostatakarzinoms	19
2.9.4	Docetaxel	19
2.9.4.1	Weitere Chemotherapeutika	20
2.9.5	Stellenwert der Strahlentherapie	20
2.9.6	Stellenwert der Nuklearmedizin	21
2.9.6.1	Untersuchungen an Zellkulturen der experimentellen Nuklearmedizin	22

<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1	Geräte und Versuchsmaterial	23
3.1.1	Geräte	23
3.1.2	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	23
3.1.3	Radiopharmaka	24
3.1.4	Medikamente, Hemmstoffe und Antikörper	24
3.1.5	Puffer und Medien	25
3.1.5.1	Puffer für die Gelelektrophorese und den Western Blot	25
3.1.5.2	Medien für die Zellkultur und Puffer zur Bestimmung des $^{68}\text{Ga}$ -Uptake in-vitro	26
3.1.6	Software	26
3.2	Methoden	26
3.2.1	Zellkultivierung	26
3.2.1.1	Auftauen und Passagieren der Tumorzellen	27
3.2.1.2	Einfrieren der Tumorzellen	27
3.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl	28
3.2.1.4	Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeiten	28
3.2.2	Vorbereitung der Aufnahmeversuche	28
3.2.2.1	Bestimmung der Zellvitalität unter verschiedenen Kulturbedingungen	28
3.2.3	Bestimmung der Bindung von $^{68}\text{Ga}$ -PSMA	29
3.2.3.1	Michaelis-Menten-Kinetik	29
3.2.4	Nachweis des Prostata-spezifischen Membranantigens (PSMA) durch Western-Blot und Immunhistochemie	32
3.2.4.1	Zellextraktion mit anschließender SDS-PAGE und Western Blot	32
3.2.4.1.1	Gelelektrophorese	32
3.2.4.1.2	Blotting der Proteine	33
3.2.4.2	Immunfluoreszenz	34
3.2.5	Behandlung der Zellen mit Docetaxel	35
3.2.5.1	Bestimmung der $\text{IC}_{50}$ von Docetaxel	35
3.2.5.2	$^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Uptake-Messung in PC3- und LNCaP-Zellen nach	

	Vorbehandlung mit Docetaxel	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
4.1	Morphologie, Proliferation und Wachstumsbedingungen der Zellen	36
4.2	Nachweis von PSMA in LNCaP- und PC3-Zellen durch Immunfluoreszenz und Westernblotting von Proteinlysaten	38
4.3	Kinetik der $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Bindung in LNCaP-Zellen	41
4.3.1	Dosis- und Zeitabhängigkeit der $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Aufnahme	41
4.3.2	Inhibierung mit PMPA	43
4.3.3	Bestimmung der Substrataffinität und Aufnahmegeschwindigkeit von $^{68}\text{Ga}$ - PSMA nach Michaelis-Menten	44
4.4	Behandlung mit Docetaxel	45
4.4.1	Bestimmung der $\text{IC}_{50}$	45
4.4.2	Zellzahlentwicklung nach Therapie mit $\text{IC}_{50}$ über 5 Tage	46
4.4.3	Aufnahme von $^{68}\text{Ga}$ -PSMA nach Docetaxelvorbehandlung	47
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
5.1	Qualitativer und semiquantitativer Nachweis von PSMA als Zielstruktur für $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Imaging	50
5.2	Kinetik des $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Uptakes	51
5.3	Signalmodulation von $^{68}\text{Ga}$ -PSMA nach Docetaxeltherapie	53
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Thesen</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>57</b>

## I. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 2-1</b>	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 [ohne nicht-melanotischen Hautkrebs]	5
<b>Abb. 2-2</b>	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2012	5
<b>Abb. 2-3</b>	Alterspezifische Erkrankungsrate, ICD-10 C61, Deutschland 2011-2012 je 100.000	6
<b>Abb. 2-4</b>	Strukturformel von Docetaxel nach Montero	20
<b>Abb. 4-1</b>	Typisches Wachstums muster von LNCaP-Zellen [A] und PC3-Zellen [B]	36
<b>Abb. 4-2</b>	Wachstumskurven von LNCaP-Zellen (A) und PC3-Zellen (B)	37
<b>Abb. 4-3</b>	Überlebensrate von LNCaP-Zellen in Abhängigkeit vom Versuchsmedium	38
<b>Abb. 4-4</b>	Immunhistochemie: LNCaP-Zellbild	39
<b>Abb. 4-5</b>	Immunhistochemie: PC3-Zellbild	39
<b>Abb. 4-6</b>	Western Blot: Nachweis von PSMA in LNCaP-Zellen	40
<b>Abb. 4-7</b>	Uptake in counts per minutes [cpm] bei unterschiedlich eingesetzter Aktivität	41
<b>Abb. 4-8</b>	Darstellung des zeitabhängigen Uptakes von $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in LNCaP-Zellen	42
<b>Abb. 4-9</b>	Konzentrationsabhängige Hemmung der $^{68}\text{Ga}$ -PSMA Aufnahme durch PMPA	43
<b>Abb. 4-10</b>	Michaelis-Menten-Kinetik der Aufnahme von PSMA in LNCaP-Zellen	44
<b>Abb. 4-11</b>	Bestimmung der $\text{IC}_{50}$ in LNCaP Zellen	45
<b>Abb. 4-12</b>	Bestimmung der $\text{IC}_{50}$ in PC3 Zellen	45
<b>Abb. 4-13</b>	Zellzahlentwicklung nach Therapie mit Docetaxel	46
<b>Abb. 4-14</b>	$^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Aufnahme nach Co-Inkubation mit Docetaxel in LNCaP-Zellen	47
<b>Abb. 4-15</b>	Aufnahme von $^{68}\text{Ga}$ -PSMA pro Zelle	48

## II. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b>	TNM-Einteilung des Prostatakarzinoms	10
<b>Tab. 2</b>	Zur Diagnostik eingesetzte Radiopharmaka	14
<b>Tab. 3</b>	Übersicht Active Surveillance vs. Watchful Waiting	18
<b>Tab. 4</b>	Eingesetztes kaltes und heißes PSMA für Konkurrenz zur Aufnahme nach Michaelis-Menten	31
<b>Tab. 5</b>	Eingesetzte Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie	34
<b>Tab. 6</b>	Kenngrößen von eingesetzten Zelllinien	36

### III. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	counts per minute
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRU	Digital rektale Untersuchung
DTT	1,4-Dithiolthreitol
EAU	European Association of Urology
FCS	Fetales Kälberserum
FDG	Fluordesoxyglukose
FDHT	Fluordihydrotestosteron
FLT	Fluorthymidin
Gy	Gray
„heißes PSMA“	Mit <sup>68</sup> Ga markiertes „small molecule“, das an PSMA bindet
HWZ	Halbwertszeit
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision
IC <sub>50</sub>	inhibitory concentration 50%
K <sub>M</sub>	Michaeliskonstante
„kaltes PSMA“	Nicht radioaktiv markiertes „small molecule“, das an PSMA bindet
LNCaP	Prostatakarzinomzelllinie
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	phosphate buffered saline
PC3	Prostatakarzinomzelllinie
PET	Positronenemissionstomographie
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Konzentration
p.i.	post injectionem
PMPA	2-(Phosphonomethyl)pentan-1,5-dicarbonsäure
PSA	Prostata spezifisches Antigen



PSMA	Prostata spezifisches Membran Antigen
RP	Radikale Prostatektomie
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
SUV	standardized uptake value
TRUS	transrektale Ultraschall-gestützte Biopsie
V“max“	Maximalgeschwindigkeit

# 1 Einleitung und Ziel der Arbeit

In den Industriestaaten betreffen ca. 15% der bei Männern auftretenden malignen Neoplasien die Prostata (Ferlay et al. 2008). Allerdings bestehen alleine in Europa große regionale Unterschiede und die Spannweite reicht von 68.8/1000 Männer in Malta bis zu 182/1000 Männer in Belgien (Heidenreich et al. 2014a, p. 125).

Bei Prostataerkrankungen kann die sichere und eindeutige Diagnose eines Primärkarzinoms schwierig sein, ist aber unabdingbare Voraussetzung für eine fundierte Therapieentscheidung (Heidenreich et al. 2014a, p. 128; Evangelista et al. 2016).

Zu den Methoden der Wahl zur Diagnose des Prostatakarzinoms gehören in erster Linie die Digital-rektale Untersuchung (DRU), die Bestimmung der Konzentration des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Serum und, bei pathologischen Befunden, ggf. auch die transrektale Ultraschall-gestützte Biopsie (TRUS) (Heidenreich et al. 2014a, p. 126). Darüber hinaus haben die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT), die Computer-gestützte Röntgentomographie (CT) und die Skelettszintigraphie je nach Fragestellung für die Diagnostik und Kontrolle während bzw. nach Abschluss der Therapie ihren Stellenwert (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2014). Die Diagnose eines Prostatakarzinoms schließt das Staging und Grading ein, und diese Parameter fließen maßgeblich in die Entscheidung über die Therapie mit ein (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2014).

Neben der chirurgischen Resektion und Strahlentherapie als Primärtherapie kommen je nach Stadium und Ausdehnung zusätzlich Chemotherapie, und/oder nuklearmedizinische Therapien in Frage. In speziellen Fällen ist auch eine reine Beobachtung des Patienten (Active Surveillance, Watchful Waiting) indiziert (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2014).

Im Laufe der letzten Jahre haben die nuklearmedizinischen Verfahren erheblich an Bedeutung gewonnen.

In Bezug auf die Erkennung eines Rezidivs und/oder den Nachweis von Metastasen spielt die molekulare Bildgebung mit der Kombination aus Positronen-Emissionstomographie und Röntgentomographie (PET/CT) eine wichtige Rolle. Der große Vorteil der molekularen Bildgebung mit der PET/CT ist es, Stoffwechselvorgänge *in-vivo* durch Verwendung von Radiopharmaka zu visualisieren (Fox et al. 2012).

Hierzu zählten zuletzt wesentlich die Darstellung des Glukosestoffwechsels durch  $^{18}\text{F}$ Fluorodesoxyglukose ( $^{18}\text{F}$ FDG) sowie des Phosphatidylstoffwechsels durch Cholinderivate (Hong et al. 2010; Evangelista et al. 2016; Evangelista et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass Cholinderivate schnell und hauptsächlich in Prostatakarzinomgewebe sowie Lymphknoten- und Fernmetastasen aufgenommen werden (Evangelista et al. 2016; Schwarzenböck et al. 2012). Trotz vielversprechender erster Ergebnisse zeigte die Bildgebung mit Cholinderivaten hinsichtlich der Mortalität keine Vorteile (Evangelista et al. 2016) und wurde daher auch nicht in den Leitlinien zur Diagnostik des Prostatakarzinoms aufgenommen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2014, 2014; Schwarzenböck et al. 2012).

Die Erforschung weiterer Zielstrukturen in Prostatakarzinomgewebe ermöglichte die Herstellung klinisch sensitiverer Tracer. Zu diesen Zielstrukturen zählt das Prostata spezifische Membran Antigen (PSMA), das auch als Glutamat Carboxypeptidase II (GCPII) bekannt ist (Meller et al. 2015, p. 2).

PSMA ist ein Zelloberflächenprotein mit einer intra- und extrazellulären Komponente, das eine deutlich erhöhte Expression in Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu anderen Geweben zeigt (Afshar-Oromieh et al. 2013, pp. 491–492). Hieraus ergibt sich, dass PSMA ein hervorragendes Target für die nuklearmedizinische Bildgebung und Therapie darstellt (Verburg et al. 2015, p. 1). Die Markierung kommerziell verfügbarer Antikörper oder PSMA-bindender Liganden mit  $^{68}\text{Ga}$  ist aufgrund einer einfacheren und kostengünstigeren Herstellung von  $^{68}\text{Ga}$  in nuklearmedizinischen Einrichtungen mit radiopharmazeutischer Abteilung möglich. Dem gegenüber sind die Herstellung von  $^{18}\text{F}$  oder  $^{11}\text{C}$  für die Synthese von  $^{18}\text{F}$ Fluorodesoxyglukose ( $^{18}\text{F}$ FDG) oder  $^{11}\text{C}$ -Cholin an ein Zyklotron gebunden (Fox et al. 2012). Weiterhin ist die Strahlenbelastung für den Patienten durch die kürzere Halbwertszeit von  $^{68}\text{Ga}$  geringer als bei der Verwendung von  $^{11}\text{C}$ - oder  $^{18}\text{F}$ -markierten Substanzen.

Derzeit wird die molekulare Bildgebung mit  $^{68}\text{Ga}$ -markierten PSMA-Liganden, kurz als  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA bezeichnet, in Hinblick auf Primär- und Rezidivdiagnostik des Prostatakarzinoms intensiver untersucht.

Präklinische und klinische Studien zielen darauf, das Uptakeverhalten von Radiopharmaka, die Bildaquisition und die richtige Befundung suspekter Läsionen zu klären.

Um besondere Aspekte der Bildgebung mit PSMA-spezifischen Liganden zu untersuchen, eignen sich Zellkulturexperimente als Modellsystem besonders gut, da sich die Versuchsbedingungen standardisieren lassen. Weiterhin sind die parallele Analyse verschiedener Zelllinien sowie Untersuchungen therapeutischer Interventionen möglich.

So konnte in in-vitro Experimenten gezeigt werden, dass durch medikamentöse Therapie die PSMA-Expression stimuliert werden kann und somit der  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Uptake erhöht sein kann (Meller et al. 2015, p. 9). Andere Arbeitsgruppen zeigten eine unveränderte PSMA-Expression nach Chemotherapie (Kuroda et al. 2009), während die Internalisierung von  $^{18}\text{F}$ FDG und  $^{18}\text{F}$ -Cholin durch eine Chemotherapie beeinflusst werden kann (Müller et al. 2009; Haberkorn et al. 1994; Haberkorn et al. 1992).

Somit lassen sich aus Untersuchungen in Zellkulturen Rückschlüsse darauf ziehen, welche Parameter für die *in-vivo* Evaluation mit Blick auf die Bildgebung vor und nach einer Therapie relevant sind. Als PSMA-positive Zellen gelten dabei LNCaP-Zellen, als Negativkontrolle können u.a. PC3-Zellen kultiviert werden (Baur et al. 2014; Eder et al. 2012; Wang et al. 2011; Schol et al. 2013; Baiz et al. 2013)

Da nur wenige in-vitro Daten zum Uptake von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA im Vergleich zu anderen Tracern und zur therapeutischen Intervention vorhanden sind, ergeben sich für die Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Kann PSMA als Zielstruktur der  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-PET-Bildgebung qualitativ und semiquantitativ in LNCaP- und PC3-Zellen nachgewiesen werden?
2. Welche charakteristischen Eigenschaften ergeben sich für das  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Imaging in LNCaP-Zellen?
3. Kann die  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Aufnahme durch eine Chemotherapie moduliert werden?

## 2 Das Prostatakarzinom

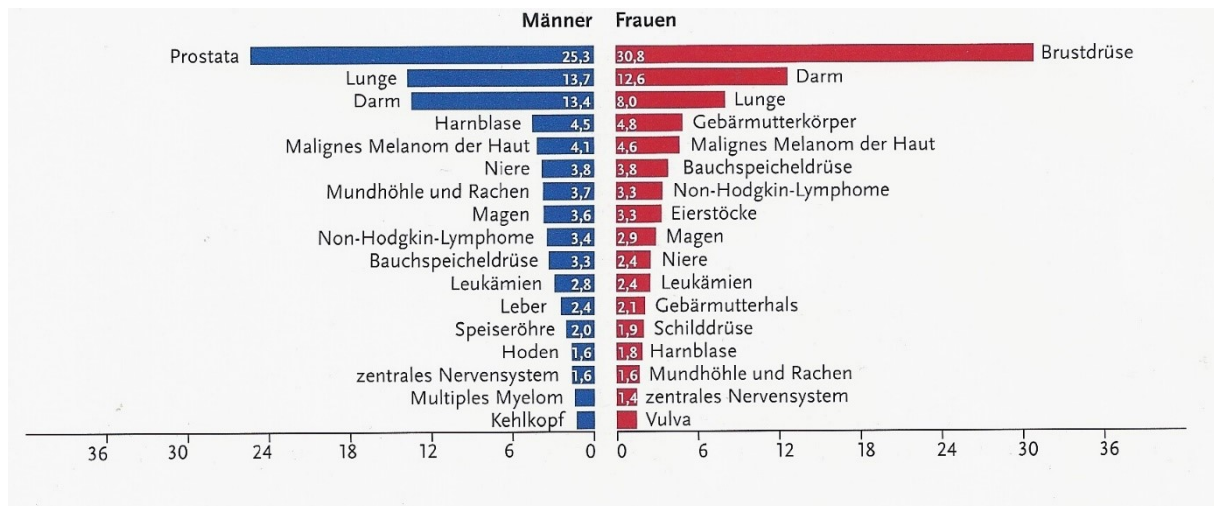
Die Kanzerogenese des Prostatakarzinoms ist noch nicht gänzlich geklärt. Bisher wurden lediglich drei Risikofaktoren identifiziert: erhöhtes Alter, ethnische Herkunft und Vererbung (Leitzmann, Rohrman 2012, p. 2). Exogene Faktoren wie Ernährung, Sexualverhalten, Alkoholkonsum, Exposition gegenüber ultraviolettem Licht und chronische Entzündungen könnten ebenfalls in der Entstehung des Prostatakrebses eine Rolle spielen (Leitzmann, Rohrman 2012).

„Bei Diagnosestellung weisen ca. 9% der Patienten Metastasen auf und 27-54% erleben ein Rezidiv nach kurativer Therapie“ (Heidenreich et al. 2014b; Heck et al. 2015).

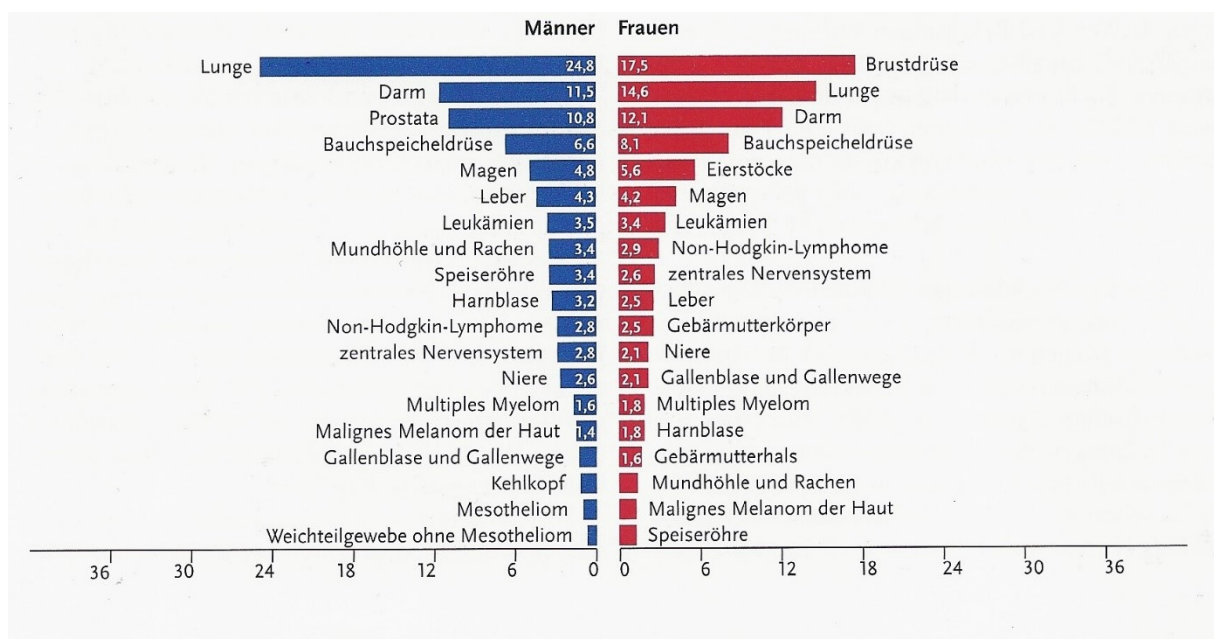
In erster Linie metastasiert das Prostatakarzinom in die angrenzenden Lymphknoten. Darüber hinaus sind Knochenmetastasen vor allem des Stammskeletts sehr häufig, während Metastasen in distanten Lymphknoten, Leber, Lunge und Gehirn deutlich seltener auftreten.

### 2.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

„Prostatakrebs ist weiterhin die häufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern in Deutschland“ (Robert Koch-Institut, p. 94). Die Inzidenz betrug 2012 63710 Neuerkrankungen pro Jahr bzw. 162,1 /100000 Einwohner (Robert Koch-Institut, p. 94). Dies macht einen Anteil von 25,3 % aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland aus (Robert Koch-Institut, p. 18). Die Sterbequote lag bei 10,8 % aller Krebsarten (Robert Koch-Institut, p. 19).

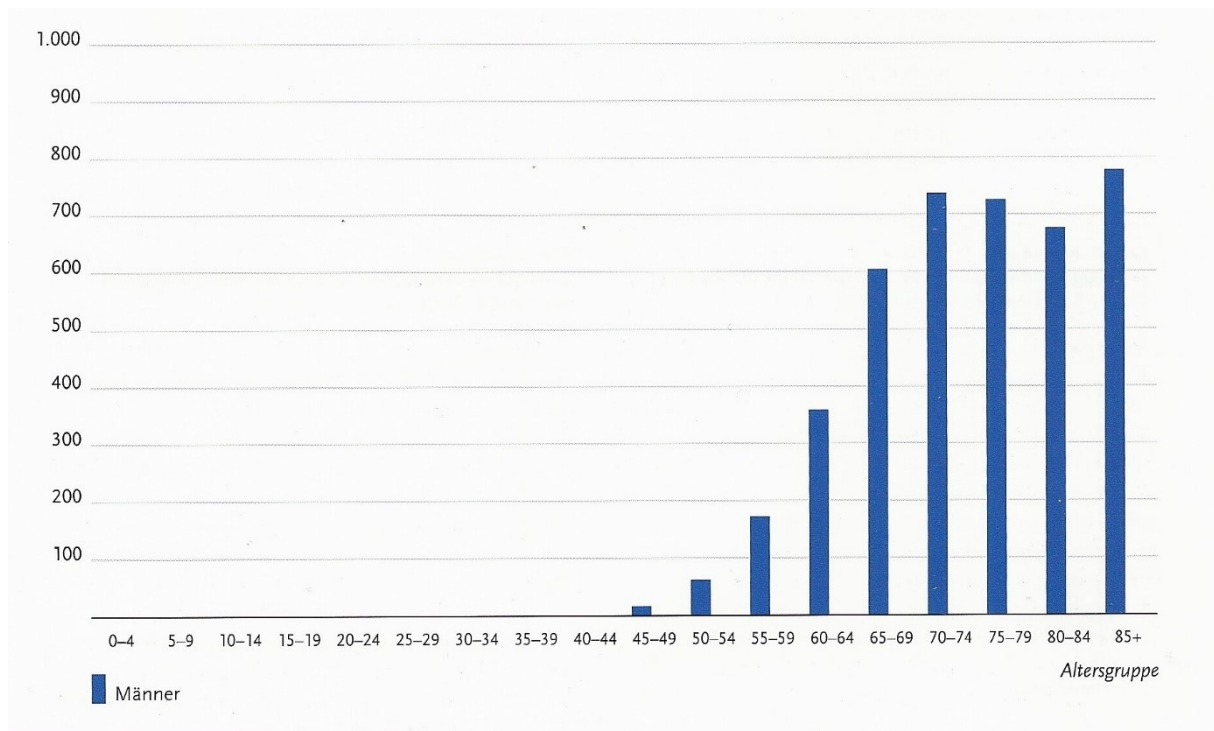


**Abb. 2-1** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 [ohne nicht-melanotischen Hautkrebs] (Robert Koch-Institut)



**Abb. 2-2** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2012 (Robert Koch-Institut)

Prostatakrebs ist eine Erkrankung des älteren Mannes. Es bestehen praktisch keine Krankheitsfälle vor dem 50. Lebensjahr. Das Risiko an Prostatakrebs zu erkranken nimmt mit dem Alter zu (Robert Koch-Institut, p. 94).



**Abb. 2-3** Altersspezifische Erkrankungsrate, ICD-10 C61, Deutschland 2011-2012 je 100.000 (Robert Koch-Institut)

Wegen seines in der Regel langsamen Wachstums ist das Prostatakarzinom oft nicht die Todesursache eines Patienten. Durch Autopsien konnte gezeigt werden, dass gerade in hohen Altersgruppen bisher klinisch inapparente Karzinome vorkommen (Sánchez-Chapado et al. 2003, p. 242).

## 2.2 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Eine sichere Diagnose sowie ein genaues Staging und Grading sind Voraussetzung für eine leitliniengerechte adäquate Therapie.

Zu den Methoden der Wahl bei der Diagnose des Prostatakarzinoms gehören die DRU, die Bestimmung der Serum PSA-Konzentration und die TRUS gestützte Biopsie (Heidenreich et al. 2014a, p. 126; Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018). Die Primärdiagnostik von MRT in Kombination mit einer im Anschluss gezielten Biopsie suspekter Läsionen weist hierbei einen Vorteil gegenüber der alleinigen systematischen Biopsie auf. Die beste Diagnoserate liegt bei einer Kombination aus gezielter und systematischer Biopsie vor. Weiterführende Verfahren (CT, Skelettszintigraphie oder PET-CT) kommen hingegen nur bei

ausgewählten Fragestellungen in Betracht bzw. im Rahmen der Rezidivdiagnostik (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018).

## 2.3 Screening-Untersuchungen zur Früherkennung des Prostatakarzinoms

Auf Grundlage der zuletzt durchgeführten, großen randomisierten Studien haben die meisten urologischen Fachgesellschaften beschlossen, dass ein generelles Massenscreening nicht angemessen erscheint. Trotzdem sollte eine Früherkennungsuntersuchung dem gut informierten und interessierten Patienten zugänglich gemacht werden (Heidenreich et al. 2014a, p. 126). In Betracht kommt hierbei neben der digital-rektalen Untersuchung unter anderem auch die quantitative Bestimmung der Konzentration des Prostata spezifischen Antigens (PSA) in einer Serumprobe.

## 2.4 Prostata spezifisches Antigen (PSA)

Das Prostata-spezifische Antigen (PSA) ist ein von der Prostata gebildetes Protein und dient der Verflüssigung des Spermas. Ein PSA-Screening kann nach Empfehlung der EAU ab einem Alter von 45 Jahren erfolgen und der dann bestimmte PSA-Spiegel zum Vergleich in den Folgejahren dienen (Schröder et al. 2009). Der PSA-Spiegel sollte mit zunehmendem Alter konstant bleiben, eine ansteigende Konzentration spricht mit großer Wahrscheinlichkeit für ein Prostatakarzinom (Heidenreich et al. 2014a, p. 126). Bei initialem PSA-Spiegel <1ng/ml ist eine Überprüfung nach 4 Jahren, bei Werten zwischen 1-2ng/ml nach 2 Jahren ausreichend (Heidenreich et al. 2013, p. 351). PSA-Werte größer 2ng/ml ziehen eine jährliche Kontrolle nach sich (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018)

## 2.5 Prostata spezifisches Membran Antigen (PSMA)

Das Prostata-spezifische Membran Antigen (PSMA; Glutamatcarboxypeptidase II (GCPII); N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamatpeptidase (NAALADaseI); Folathydrolase I; EC: 3.4.17.21) ist eine Zink-abhängige Protease (Wang et al. 2010). Unter physiologischen Bedingungen hydrolysiert PSMA die Prostataflüssigkeit (Fair et al. 1997) und wirkt als Folat-Hydrolase (Barren et al. 1997).



Das transmembranöse Glykoprotein ist durch eine im Vergleich zu Niere, kleinen intestinalen Drüsen oder Speicheldrüsen signifikant höhere Expression im Prostatakarzinom gekennzeichnet (Afshar-Oromieh et al., p. 487; Troyer et al. 1997).

Aufgrund der Lokalisation als Membranprotein ist PSMA eine mögliche Zielstruktur für Antikörper und andere Bindungsproteine (Barren et al. 1997) unter anderem auch, weil PSMA-negative Prostatakarzinome sehr selten vorkommen (Afshar-Oromieh et al. 2013, p. 494). Für die Bildgebung mittels PET-CT müssen alle PSMA-Liganden mit einem Tracer (Nuklid) gekoppelt werden. Diese Liganden binden nach Applikation an der spezifischen Bindungsstelle im Sinne eines Schlüssel-Schloss-Prinzips.

Grundlage aller „small molecule“ PSMA-Liganden ist ein Glu-urea-Lys-Motiv, welches an der katalytischen Domäne des PSMA-Moleküls bindet (Afshar-Oromieh et al. 2015, p. 125).

Studien konnten ebenfalls zeigen, dass eine Chemotherapie keinen wesentlichen Einfluss auf die PSMA-Expression in Prostatakarzinomzellen hat. Auch ein Androgenentzug beeinflusst weder im Tumor noch in Lymphknotenmetastasen die PSMA-Expression (Wright et al. 1996).

## 2.6 Histopathologische Charakterisierung des Prostatakarzinoms

Zu den Subtypen des Prostatakarzinoms zählen das azinäre Karzinom, das duktales Adenokarzinom, das adenosquämöse Karzinom, das Plattenepithelkarzinom, das kleinzellige Karzinom und das sarkomatoide Karzinom. Die mit am häufigsten diagnostizierte Form ist der azinäre Subtyp (Varma et al. 2002). „Die histopathologischen Tumortypen gehen mit unterschiedlichen klinischen Verlaufsmustern einher, so gelten das duktales und das kleinzellige Prostatakarzinom als aggressive Tumoren, die eine Neigung zu lokaler Progredienz und Metastasierung aufweisen“ (Marcus et al. 2012).

## 2.7 Grading und Staging des Prostatakarzinoms

Der Gleason-Score wird zum Grading empfohlen (Heidenreich et al. 2014a, p. 125). Er beurteilt ausschließlich die Architektur der neoplastischen Prostata und unterscheidet in 5 Wuchsformen, denen ein Punktwert von 1 bis 5 zugeordnet ist. Häufig kommen in einer Neoplasie verschiedene Wuchsformen vor, so dass ein Score aus den zwei häufigst vorkommenden Wuchsformen gebildet wird. 2-4 Punkte weisen ein geringes Potential zur Progression auf, 5-6 ein mittleres und 7-10 ein hohes (Weirich 2015, p. 76).

„Im Gegensatz zum Grading ist das Staging der Prostatakarzinome ein vom histologischen Subtyp unabhängiger Prognoseparameter“ (Weirich 2015, p. 76). Es kommt erst dann zum Einsatz, wenn eine maligne Neoplasie gesichert wurde. Mit unterschiedlichen Methoden wird untersucht, ob die Erkrankung noch auf die Prostata begrenzt ist, ob die Organgrenze bereits überschritten und benachbarte Strukturen infiltriert sind, und/oder ob sich Metastasen abgesiedelt haben. Hierfür kommen im Prinzip alle bildgebenden Verfahren in Betracht. So dient zur Diagnostik einer möglichen Infiltration ausschließlich die MRT, wohingegen Skelettmetastasen durch die Skelettszintigraphie und suspekten Lymphknoten durch die CT dargestellt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018). Die direkte manuelle Untersuchung sowie die histopathologische Aufarbeitung nach Tumorbiopsie sind ebenfalls wichtige Bestandteile des Stagings. „Die Stadieneinteilung zeigt, dass drei von vier Tumoren in einem frühen Stadium (T1 oder T2) diagnostiziert werden“ (Robert Koch-Institut, p. 94).

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen und pathologischen Befunde werden im TNM-System zusammengefasst und die Kombination aus Staging und Grading erlauben eine Aussage über die Prognose und helfen bei der Therapieplanung.

**Tab. 1:** TNM-Einteilung des Prostatakarzinoms, (N. Mottet (Chair) et al. 2016)

<b>T1</b>	Tumor weder durch Tastuntersuchung oder bildgebendes Verfahren sichtbar
a	Tumor in weniger als 5 % des biopsierten Gewebes
b	Tumor in mehr als 5 % des biopsierten Gewebes
c	Diagnose nach erhöhtem PSA-Wert durch Nadelbiopsie
<b>T2</b>	Tumor auf Prostatakapsel begrenzt (lokal begrenztes Prostatakarzinom)
a	Tumor in weniger als 50 % eines Seitenlappens
b	Tumor in mehr als 50 % eines Seitenlappens
c	Tumor in beiden Seitenlappen
<b>T3</b>	Tumor wächst über Prostatakapsel hinaus
a	Tumorausbreitung ein - oder beidseitig über Kapsel hinaus, Samenblase tumorfrei
b	Tumorausbreitung ein- oder beidseitig über Kapsel hinaus und in Samenblase
<b>T4</b>	Tumorausbreitung in Nachbarstruktur oder nicht verschiebbar
<b>NX</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine Metastasen in benachbarten Lymphknoten oder regionären Lymphknoten (Beckenlymphknoten)
<b>N1</b>	Metastasen in benachbarten Lymphknoten
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen nachweisbar
<b>M1</b>	Fernmetastasen vorhanden
a	Nichtregionäre(r) Lymphknoten
b	Knochenmetastasen
c	Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen

## 2.8 Bildgebungsverfahren zur Diagnose des Prostatakarzinoms

Die zunehmende Inzidenz des Prostatakarzinoms stellt eine neue Herausforderung für die bildgebende Diagnostik im Sinne der Früherkennung dar (Oehr, Bouchelouche 2007, p. 259). Laut aktueller S3-AWMF-Leitlinien werden die meisten bildgebenden Verfahren in der

Primärdiagnostik sehr zurückhaltend und indikationsspezifisch empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018).

### 2.8.1 Ultraschall

Die Sonographie als das am häufigsten verfügbare und kostengünstigste bildgebende Verfahren ist aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken.

Die TRUS gehört im Rahmen der Nadelbiopsie und Brachytherapie zum Standard (Hara et al. 2008; Oehr, Bouchelouche 2007). Dopplersonografisch kann der Blutfluss über Gefäßen der Prostata dargestellt werden. Eine erhöhte Perfusion ist oft mit einem malignen Geschehen assoziiert (Oehr, Bouchelouche 2007, p. 259). „Für das lokale Staging des Prostatakarzinoms mittels TRUS ergaben sich eine Sensitivität von 15-68% und eine Spezifität von 63-97% ((Walz et al. 2013)13)“ (Rørvik et al. 1994; Brock et al. 2011). Wegen der Ungenauigkeit der TRUS ist sie deshalb zur Diagnose oft unzureichend. Weitere Verfahren sind die Elastographie, der Kontrastmittelultraschall und das Histoscanningsystem. Diese Verfahren sind aber speziellen Fragestellungen vorbehalten.

### 2.8.2 Skelettszintigraphie

Die Skelettszintigraphie mit  $^{99m}\text{Tc}$ -Di-Phosphatverbindungen (z.B. Diphosphono-Propandikarbonsäure / Methylendiphosphonat) gilt als Standard zur Abklärung einer Skelettmetastasierung (Taoka et al. 2001). Die Datenakquisition erfolgt durch Einzelphotonen-Emissionscomputertomografie (SPECT) frühestens 120 min nach Applikation des  $^{99m}\text{Tc}$ -markierten Tracers. Auch hier gilt, dass Bereiche mit erhöhtem Knochenstoffwechsel, also Tumoren und Metastasen, mehr Radiopharmakon als das umliegende Knochengewebe anreichern. Falsch positive Ergebnisse können bei Frakturen oder Verschleiß (z.B. Arthrose) vorkommen, da auch hier ein erhöhter Knochenstoffwechsel üblich ist. Nach aktuellen S3-Leitlinien sollte ab einem PSA-Level  $> 10$  ng/ml oder einem Gleason-Score  $\geq 8$  oder einer T-Kategorie cT3/4 oder Knochenschmerzen eine Skelettszintigraphie zur Metastasensuche erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018).

### 2.8.3 MRT-Diagnostik

Die MRT ist das Verfahren der Wahl, um die Infiltration in angrenzende Strukturen zu erkennen. Bei lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom wird im Vorfeld einer Strahlentherapie die MRT als einziges Verfahren empfohlen (Eiber et al. 2015, p. 100).

Neben den bisher eingesetzten T1- und T2-Wichtungen erfolgt zunehmend der Einsatz der multiparametrischen MRT der Prostata. Sie erfasst über die Morphologie der Prostata hinaus auch Eigenschaften wie Zelldichte (Diffusion), Proliferation (Stoffwechsel) und Neovaskularisation (Kontrastmitteldynamik) (Schlemmer 2010, p. 1068). Bei negativen Biopsien kann die normale MRT zur weiteren Diagnostik eingesetzt werden, während auf die diffusionsgewichtete MRT zunächst verzichtet werden kann (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018).

### 2.8.4 CT-Diagnostik

Die CT-Diagnostik kommt bei der Frage nach suspekten Lymphknoten zum Tragen. Ein regulärer Einsatz im Rahmen eines Staging wird aktuell nicht empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018). Bei metastasiertem Prostatakarzinom oder bei Rezidivdiagnostik nach Prostatektomie oder Strahlentherapie in Kombination mit der PET dient sie zur Lokalisation von Metastasen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018).

### 2.8.5 PET-Diagnostik und Tracer für den Einsatz beim Prostatakarzinom

Grundlage der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist die Applikation eines Positron emittierenden Radionuklids. Dies ist in der Regel an einen Träger gekoppelt und dieser Träger bindet spezifisch an eine definierte Zielstruktur und sorgt dadurch für eine Internalisierung des Radionuklids.

Aufgrund einer entgegengesetzten Ladung von Positronen im Atomkern und Elektronen in der Atomhülle können beide Teilchen nicht nebeneinander existieren. Werden nun Positronen aus dem Atomkern emittiert und treffen auf ihrer Bahn auf ein Elektron, so rekombinieren beide Teilchen, d.h. sie „vernichten“ sich gegenseitig. Hierbei entsteht Vernichtungsstrahlung

(Gammastrahlung) in Form zweier Gammaquanten, welche dann in entgegengesetzter Richtung zum Zerfallsort in Lichtgeschwindigkeit davongetragen werden.

Die Detektoren in einem PET-Scanner sind ringförmig angeordnet und Quanten, die in einem Winkel von  $180^\circ$  zueinander koinzident auf den Ring treffen, werden einander zugeordnet. Nach Untersuchungsende erfolgt die Computer-gestützte grafische Rekonstruktion.

In der klinischen Routine folgt der PET oftmals direkt eine Computertomographie (CT), um nach Fusion beider Datensätze eine genaue topographische Zuordnung der in der PET identifizierten suspekten Anreicherungen zu ermöglichen.

Seit Jahren werden  $^{18}\text{F}$ -Fluordesoxyglukose,  $^{11}\text{C}$ -Methionin,  $^{18}\text{F}$ -Fluordihydrotestosteron,  $^{11}\text{C}$ -Acetat,  $^{11}\text{C}$ -markierte zyklische Aminosäuren sowie  $^{11}\text{C}$ -Cholin und  $^{18}\text{F}$ -Cholinderivate zur Bildgebung beim Prostatakarzinom erforscht (Tab. 2) (Evangelista et al. 2016; Haberkorn et al. 1992; Afshar-Oromieh et al. 2013; Schwarzenböck et al. 2015; Schwarzenböck et al. 2013). In den letzten Jahren wurde neben den Cholin-basierten Radiopharmaka insbesondere der Einsatz von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in der PET/CT untersucht (Afshar-Oromieh et al. 2014).

Eine aktuelle Empfehlung für den Einsatz der PET/CT im Rahmen des Prostatakarzinoms liegt für die Bildgebung mit  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Radiopharmaka vor (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018). Aufgrund einer Studienlage mit geringen Fallzahlen wird ein Einsatz der PET/CT im Rahmen der Primärdiagnostik lediglich in prospektiv vergleichenden Studien mit patientenrelevanten Endpunkten empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018). Im Rahmen einer Rezidivdiagnostik kann eine  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-PET/CT durchgeführt werden, sofern das Ergebnis eine mögliche Relevanz auf die weitere Therapie nach sich zieht (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018), wie beispielsweise eine Dokumentation von Metastasenausdehnung beim Rezidiv oder Verlaufskontrollen nach Therapie.

**Tab. 2** Zur Diagnostik eingesetzte Radiopharmaka (modifiziert nach Evangelista et al., 2016)

<b>Radiopharmakon</b>	<b>HWZ*</b>	<b>Mechanismus</b>	<b>Quelle</b>
$^{18}\text{F}$ -FDG	110 min	Zelltrapping von FDG im Verlauf der Glykolyse	(Jimenez-Bonilla et al. 2015)
$^{11}\text{C}$ -Methionin	20 min	Natürliche Aminosäure; zeigt erhöhten Aminosäure-Transport an	(Bouchelouche, Oehr 2008)
$^{18}\text{F}$ -FDHT	110 min	Androgenrezeptorexpression und Bindungskapazität	(Dehdashti et al. 2005)
$^{11}\text{C}$ -Acetat	20 min	Physiologischer Metabolit im Fettstoffwechsel, Umsatz zu Acetyl-CoA	(Albrecht et al. 2007)
$^{18}\text{F}$ -FACBC	110 min	Synthetisches L-Leucin-Analogon; zeigt erhöhten AS-Transport an	(Nanni et al. 2013)
$^{18}\text{F}$ -FLT	110 min	Proliferationsdarstellung	(Bouchelouche, Oehr 2008)
$^{11}\text{C}$ -Cholin	20 min	Substrat für den Einbau in die Zellwand	(Schwarzenböck et al. 2016)
$^{18}\text{F}$ -Cholin	110 min	Substrat für den Einbau in die Zellwand	(Schwarzenböck et al. 2016)
$^{68}\text{Ga}$ -HBDDC	67 min	Antikörper gegen ein Epitop der extrazellulären Domäne von PSMA	(Afshar-Oromieh et al. 2013)
$^{89}\text{Zr}$ -DFO-huJ591	78,4 h	Monoclonaler Antikörper gegen eine extrazelluläre Domäne von PSMA	

\*die Halbwertszeit bezieht sich auf das eingesetzte Nuklid.

#### 2.8.5.1 *Einsatz von FDG für die PET-Bildgebung*

Tumorzellen haben aufgrund ihres hohen Stoffwechsels sowie der raschen Proliferation auch einen erhöhten Bedarf an Glukose. Radioaktiv markiertes FDG wird genauso wie Glukose über Glukosetransporter (z.B. GLUT 2) in die Zelle aufgenommen und dient als Substrat der Hexokinase. Allerdings akkumuliert es nach Phospholisierung an Position 6 als Fluorodeoxy-6-Phosphat-Glukose in der Zelle, da dieses Produkt nicht weiter hydrolysiert werden kann. Ein erhöhter „standardized uptake value“ (SUV) von FDG in der PET/CT im Vergleich zur Umgebung spricht somit für einen erhöhten Stoffwechsel.

Effert et al. konnten zeigen, dass der FDG-Uptake sowohl in benignem (z.B. benigne Prostatahyperplasie) als auch im malignem Prostatagewebe erhöht ist (Effert et al. 1996). Weiterhin erfolgt die Ausscheidung von nicht verstoffwechseltem FDG über die Blase. Durch die topographische Nähe von Ureter, Blase und Prostata ist eine genaue Beurteilung von Anreicherungen oftmals nicht möglich (Fanti et al. 2007). Da zwischen dem Uptake durch gesundes Prostatagewebe, benigner Prostatahyperplasie und Prostatakarzinomgewebe nur geringe Unterschiede bestehen und die Topographie eine Differenzierung zusätzlich erschwert, ist der Einsatz der  $^{18}\text{F}$ -FDG aktuell nicht zu empfehlen. Lediglich aggressive Prostatakarzinome zeigen einen signifikant höheren SUV im Vergleich zur Umgebung (Jadvar 2013).

#### 2.8.5.2 $^{18}\text{F}$ -Cholin / $^{11}\text{C}$ -Cholin

Grundlage für die Verwendung von markierten Cholinderivaten ist eine deutlich höhere Expression von Phosphatidylcholin in der Zellmembran und somit ein erhöhter Bedarf von Phosphorylcholin in proliferierenden Zellen (Schwarzenböck et al. 2012, p. 319). Nach Aufnahme über ein hochaffines Cholin-Transporter-System wird das Substrat im ersten Schritt des Kennedy-Pathway durch die Cholin-Kinase zu Phosphatidylcholin metabolisiert (Schwarzenböck et al. 2012, p. 319; Müller et al. 2009) und im weiteren Verlauf in die Zellmembran eingebaut.

#### 2.8.5.3 $^{68}\text{Ga}$ -PSMA

PSMA hat sich als geeignete Zielstruktur für die Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms gezeigt (Verburg et al. 2015, p. 1). Anstelle eines Antikörpers wird ein



Oligopeptid mit hoher Affinität zu einer PSMA-Spezifischen Aminosäuresequenz innerhalb der katalytischen Domäne des PSMA verwendet.

Dieses Oligopeptid enthält ein Glu-urea-Lys-Motiv und kann durch Bindung an einen Spacer (Ahx) an das Nuklid  $^{68}\text{Ga}$  gekoppelt werden. Durch den Einsatz des Spacers wird die lipophile Eigenschaft des Chelators HBED-CC nicht beeinträchtigt, was eine sehr stabile Bindung an PSMA zeigt (Afshar-Oromieh et al. 2015). Die Bindungsstelle beim PSMA<sup>HBED</sup> liegt am hydrophilen Ende an einer Carboxy-Gruppe. Somit wird der hydrophobe Schwanz, der die Bindung mit dem PSMA-Oberflächenantigen möglich macht, nicht beeinflusst.

Nach Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA (PSMA-bindendes Oligopeptid gekoppelt an  $^{68}\text{Ga}$ ) an die extrazelluläre Domäne des PSMA wird dieses internalisiert (Afshar-Oromieh et al. 2015, p. 125). Es besteht ein physiologisch hoher Uptake in Speicheldrüsen und Nieren sowie ein geringerer in Tränendrüsen, Leber, Milz, Blase und gesundem Prostatagewebe (Afshar-Oromieh et al. 2013, p. 492).

Den größten Vorteil zeigt  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA gegenüber anderen in der Diagnostik verwendeten Radiopharmaka vor allem in der hohen Detektionseffizienz von Tumorgewebe bei niedrigem PSA-Level, bei kleinen Lymphknotenmetastasen und bei Knochen- und Lebermetastasen mit geringem Hintergrundsignal (Afshar-Oromieh et al. 2014, p. 19). Läsionen, welche karzinomverdächtig erschienen, zeigten sich bereits nach 1 h p.i. mit einer hohen Aufdeckungsrate auch bei niedrigem PSA-Spiegel (Afshar-Oromieh et al. 2013, p. 494).

Ein Vorteil des Nuklids  $^{68}\text{Ga}$  ist die im Verhältnis zu  $^{18}\text{F}$  günstige Verfügbarkeit, aufgrund der Gewinnung aus dem ebenfalls radioaktiven Mutternuklid  $^{68}\text{Ge}$  in einem  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator.

#### *2.8.5.3.1 Synthese von $^{68}\text{Ga}$ -PSMA*

Die Synthese des  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA erfolgte vollautomatisiert mit dem GRP-Synthesemodul der Firma Scintomics im Reinraum der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin. Dabei wurde ein sogenanntes Ga-Peptid-Kit zur kationischen  $^{68}\text{Ga}$ -Aufreinigung der Firma ABX (Produktnummer SC-01) in die Apparatur eingespannt, 30 µl des Precursors PSMA-11 (1 µg/µl, Firma ABX, Produktnummer 9919) in den Reaktor vorgelegt und mit dem zum Synthesekit zugehörigen HEPES-Puffer (1.5 M, 3ml) vermengt. Die anschließende Synthese wurde automatisiert über eine von der Firma ABX bereitgestellte Herstellungssequenz (Gacat\_Sc-01\_R1-4) gesteuert. Der grundsätzliche Ablauf bei der Markierung des Peptides stellt sich dabei wie folgt dar:

Zunächst wird der an das Synthesemodul angeschlossene  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator (GalliaPharm, Firma Eckert und Ziegler) durch ein modulseitig hergestellten Unterdruck eluiert. Das  $^{68}\text{Ga}$ -haltige salzsaure Eluat (0,1 N HCl) wird über eine psH<sup>+</sup>-Kartusche geleitet, wobei das [ $^{68}\text{Ga}$ ]-Gallium auf dieser getrappt und die Salzsäure in den Abfall geleitet wird. Im Anschluss wird das [ $^{68}\text{Ga}$ ]-Gallium durch Zugabe von etwa 3 ml 5 M NaCl-Lösung direkt in den Reaktor mit dem in HEPES-Puffer vorgelegten PSMA-11 überführt. Das Reaktionsgemisch wird für 10 Minuten bei 120°C erwärmt. Im Anschluss an die Markierungsreaktion wird der Inhalt des Reaktors gekühlt und über eine Sep-Pak Light C<sub>18</sub>-Kartusche geleitet.  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA wird dabei auf der Kartusche zurückgehalten, während die übrigen Bestandteile des Reaktionsgemischs die Kartusche durchlaufen. Im folgenden Schritt wird der Reaktor mit Wasser gespült und die Waschlösung analog über die Sep-Pak Light C<sub>18</sub>-Kartusche geleitet. Abschließend wird das  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA mit 1.6 ml 50%-igem Ethanol von der Sep-Pak Light C<sub>18</sub>-Kartusche eluiert, in das Produktvial überführt und mit 14.4 ml phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung (PBS) verdünnt.

## 2.9 Therapie des Prostatakarzinoms

Nicht jede Diagnose eines Prostatakarzinoms hat zwingend eine Therapie zur Folge. Vielmehr führt die Kombination aus Staging und Grading unter Berücksichtigung des Alters, der Gesundheit und der Lebenssituation des Patienten zur Festlegung eines individuellen Therapiekonzepts.

Ein Primärtumor sowie Rezidive können kurativ behandelt werden, solange sie auf die Prostata begrenzt sind. Hier sind die radikale Prostataektomie oder die primäre Strahlentherapie Therapie der Wahl (Oehr, Bouchelouche 2007, p. 259). Bei einer Metastasierung kommen hormonelle Therapie, Chemotherapie oder Immuntherapie zum Einsatz (Oehr, Bouchelouche 2007, p. 259). Weiterhin werden Verfahren der Strahlentherapie und auch radionuklidbasierte Therapieverfahren der Nuklearmedizin eingesetzt.

### 2.9.1 Active Surveillance / Watchful Waiting

Active Surveillance (AS) beschreibt eine durchaus geläufige „Therapieform“, bei der Patienten mit einem „low-risk“ Tumor initial nicht behandelt, jedoch engmaschig kontrolliert werden. Ob ein Patient für Active Surveillance geeignet ist, hängt von mehreren Punkten ab:

Lebenserwartung, gesundheitliche Konstitution, potentielle Nebenwirkungen einer Therapie, Krankheitsausmaß und persönliche Präferenz des Patienten (Chung, Lee 2016, p. 14). Bei Progression erfolgt unter kurativem Gesichtspunkt eine sofortige Therapie (Heidenreich et al. 2014a, p. 128). Das Ziel von AS ist es, die Übertherapie bei Patienten mit gesichertem low-risk Tumor und keinem erwartbarem Therapienutzen zu vermeiden. Diese Strategie wird zum Beispiel bei Patienten mit einer Lebenserwartung von mehr als zehn Jahren empfohlen (Chodak et al. 1994).

Das Konzept von Active Surveillance kann man auch bei weit fortgeschrittenem, nicht mehr kurativem Prostatakrebs anwenden, wenn eine Therapie keinen Vorteil für den Patienten erwarten lässt und die negativen Folgen der Therapie überwiegen. In diesem Fall spricht man von Watchful Waiting (WW).

**Tab. 3:** Übersicht Active Surveillance vs. Watchful Waiting; Modifiziert nach (Chung, Lee 2016)

	Active Surveillance	Watchful Waiting
<b>Behandlungsintention</b>	Kurativ	Palliativ
<b>Follow-up</b>	Definierter Zeitplan	Patienten-spezifisch
<b>Protokoll/Marker für Follow-up</b>	DRU, PSA, Rebiopsie, optional MRT	Nicht vorgegeben
<b>Lebenserwartung</b>	Größer 10 Jahre	Kleiner 10 Jahre
<b>Ziel</b>	Minimierung therapie-spezifischer Nebenwirkungen ohne zu erwartenden Überlebensvorteil für den Patienten	Minimierung therapiespezifischer Nebenwirkungen
<b>Kommentar</b>	Nur für low-risk Patienten geeignet	Möglich für Patienten aller Stadien

### 2.9.2 Operative Verfahren

Die radikale Prostatektomie (RP) ist hauptsächlich beim primären Karzinom das operative Verfahren der Wahl. Bei Lokalrezidiven kann ebenfalls über einen operativen Eingriff nachgedacht werden. In jedem Fall stellen die enge topographische Beziehung zwischen Blase,

Rektum, Samenstrang und Prostata, sowie die Erhaltung von Kontinenz und Potenz hohe Anforderungen an den Urologen. Bill-Axelson et al. zeigten einen deutlichen Vorteil der RP im Vergleich zu abwartenden Strategien sowie eine geringere Metastasierungsrate und eine seltenere Indikation zur Hormontherapie (Bill-Axelson et al. 2014). Alle Rezidive mit Invasion in benachbarte Strukturen oder gar einer metastatischen Streuung benötigen deutlich erweiterte Maßnahmen (Heck et al. 2015). Hierzu zählen unter anderem eine systemische Chemotherapie sowie strahlentherapeutische oder nuklearmedizinische Verfahren.

### 2.9.3 Systemische Therapie des Prostatakarzinoms

Bei einem primär metastasierten Prostatakarzinom zeigte die Kombination aus Hormonentzug- und Chemotherapie den größten Überlebensvorteil (Heck et al. 2015, p. 79).

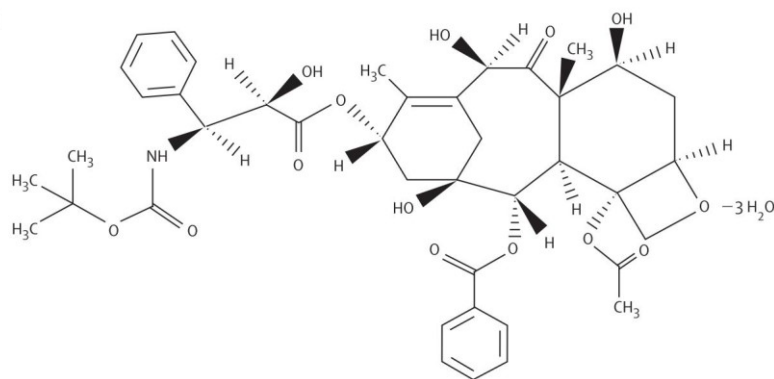
Das männliche Sexualhormon Testosteron stimuliert das Wachstum von Prostatazellen. Ziel der Hormonentzugstherapie ist somit der komplette Entzug von Testosteron, um den Stimulus für das Prostatagewebe zu vermeiden. Diese Therapie bringt keine Heilung, kann den Progress aber deutlich verlangsamen.

Ein Hormonentzug kann entweder medikamentös oder durch plastische Orchiektomie erreicht werden (van Asseldonk et al. 2016). Steigt ein PSA-Wert trotz suffizienter antiandrogener Therapie an, so wird von einem kastrationsrefraktären Prostatakarzinom gesprochen.

### 2.9.4 Docetaxel

Docetaxel wird halbsynthetisch durch Modifikation der in den Nadeln der Pazifischen Eiche (*Taxus brevifolia*) enthaltenen Taxane hergestellt (Chen et al. 2016, p. 152; Schiff et al. 1979). Als Mitosegift greift Docetaxel am Mikrotubulussystem ( $\beta$ -Tubulin) des Zellkerns an (Montero et al. 2005) und bewirkt den Arrest des Zellzyklus in der späten G2-Phase und /oder M-Phase mit anschließender Apoptose der Zelle durch erhöhte Polymerisation der Tubuli (Schiff et al. 1979).

Die Chemotherapie mit Docetaxel galt lange als einziger Standard für die Therapie des metastasierten kastrationsrefraktären Prostatakarzinoms (Aragon-Ching 2015, p. 1). Der Einsatz ist palliativ und lebensverlängernd (Antonarakis, Armstrong 2011).



**Abb. 2-4** Strukturformel von Docetaxel nach Montero, Fossella et al (2) (Montero et al. 2005, p. 230)

#### 2.9.4.1 Weitere Chemotherapeutika

Parimi et al. zeigten in ihrer Arbeit eine Übersicht über verschiedenen Chemotherapiekombinationen und deren Erfolg (Parimi, Chi 2016). Hierzu zählen u.a. Therapien mit Bicalutamid, Mitoxantrone, LHRH-Agonisten, Cyclophosphamid, Estramustin und Mitomycin C (Parimi, Chi 2016). Aktuell zugelassen sind drei neue Präparate bzw. Präparatekombinationen: Sipuleucel-T, Cabazitaxel mit Prednisolon und Abirateronacetat mit Prednisolon. Diese Präparate bewirken unter anderem bei skelettalen Läsionen einen signifikanten Rückgang (Antonarakis, Armstrong 2011). Weiterhin steht der Androgen-Rezeptor-Antagonist Enzalutamid zur Verfügung, der die Bindung des Androgenrezeptors inhibiert und somit die Translokation in den Zellkern und die Interaktion zwischen Androgenrezeptor und DNA hemmt (Aragon et al 2012).

#### 2.9.5 Stellenwert der Strahlentherapie

Die Strahlentherapie wird ebenso wie die chirurgischen Verfahren als Versuch der Kuration eingesetzt und kann auch als alleinige Therapieform indiziert sein (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018). Aber auch palliative Behandlungskonzepte liegen vor. Bei niedrigem Risikoprofil kann eine perkutane Strahlentherapie mit einer Gesamtdosis von mindestens 74 Gy als Monotherapie angeboten werden (Bartkowiak et al. 2015). Liegt ein intermediäres Risiko vor, kann, unter Berücksichtigung der Nebenwirkungen, die Dosis bis auf 80 Gy eskaliert werden (Bartkowiak et al. 2015).

Die permanente Seed-Implantation ist ein weiteres kuratives Verfahren. Hierbei werden transperineale Applikationen von Jod-125 bzw. Palladium-103 verwendet (Bartkowiak et al. 2015).

Je nach Tumorstadium bzw. Rezidiven kann weiterhin eine adjuvante Strahlentherapie oder eine frühe Salvage Strahlentherapie indiziert sein.

## 2.9.6 Stellenwert der Nuklearmedizin

Theranostik bezeichnet den parallelen Einsatz von Radioliganden für Diagnostik und Therapie, sofern ein tumorspezifisches, molekulares Target bekannt ist, und ein spezifisches „Radionukleotidvehikel“ verfügbar ist. Prominentes Beispiel ist der Einsatz von Radioiod zur Diagnostik und Behandlung des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms (Baum et al. 2015, p. 146). Im Falle des Prostatakarzinoms könnte PSMA ein solches Target sein. Untersuchungen zum Einsatz von  $^{68}\text{Ga}$ - und  $^{177}\text{Lu}$ -Liganden für Diagnostik ( $^{68}\text{Ga}$ ) und Therapie ( $^{177}\text{Lu}$ ) sind vielversprechend (Weineisen et al. 2014, p. 1). Nach Ausschöpfung aller empfohlenen Firstline Therapiekonzepte kann ein Therapieversuch mit  $^{177}\text{Lu}$ -PSMA dem Patienten angeboten werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018).

Darüber hinaus sind palliative Therapiekonzepte mit Alphastrahlern (Radium-223) zu nennen, welche ihre Indikation bei einer progredienten Erkrankung mit ossären Metastasen ohne Nachweis extra-össarer, distanter Metastasen hat. Vorteil der Alpha-Strahler ist die geringe Reichweite und die damit verbundene hohe lokale Strahlendosis im Knochenmetastasengewebe. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit zu Calcium wird  $^{223}\text{Ra}$  in ossäre Metastasen aufgenommen und induziert durch den hohen linearen Energietransfer DNA-Doppelstrangbrüche. Somit wirkt  $^{223}\text{Ra}$  extrem zytotoxisch (Liepe 2015). Jedoch erfasst Radium-223 keine Metastasen außerhalb knöcherner Strukturen (Liepe 2015), so dass der Einsatz auf Patienten mit rein ossärer schmerzhafter Metastasierung begrenzt ist (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018). Weiterhin können zur Schmerzreduktion bei Knochenmetastasen die Radionuklide Strontium-89, Samarium-153 und Rhenium-186 eingesetzt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2018).

#### *2.9.6.1 Untersuchungen an Zellkulturen der experimentellen Nuklearmedizin*

Zellkulturen ermöglichen es, das Uptakeverhalten von Tracern unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen und sind Voraussetzung, um in der klinischen Anwendung PET/CT-Bilder zu interpretieren (Haberkorn et al. 1994). In Studien an Brustkrebszellen konnte gezeigt werden, dass der Uptake von  $^{18}\text{F}$ -FDG nach Chemotherapie in diesen Zellen dosisabhängig ansteigt (Haberkorn et al. 1992). Somit ist der Einsatz von  $^{18}\text{F}$ -FDG zur Evaluation des Therapieerfolges in frühen Stadien der Behandlung denkbar. Das ist insbesondere dann interessant, wenn der Therapieerfolg zeitnah detektiert werden kann, d.h. Patienten identifiziert werden, deren Tumoren nicht oder nur in vernachlässigbarem Maße auf die Chemotherapie ansprechen, so dass Belastungen durch eine nicht bzw. nur wenig erfolgreiche Chemotherapie minimiert werden können (personalisierte Medizin).

Ähnliche Anforderungen werden an die Verwendung von  $^{68}\text{Ga}$ -markierten PSMA-spezifischen Liganden für den Einsatz beim Prostatakarzinom gestellt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte und Versuchsmaterial

#### 3.1.1 Geräte

Zellen wurden grundsätzlich unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (NU-480-500E, Fa. NuAire, Inc.<sup>®</sup>, Plymouth, USA) gehandhabt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (ATP.line<sup>TM</sup> CB(E3) CO<sub>2</sub>-Inkubator, Fa. Binder GmbH, Tutlingen, D) und eine Zellzählung erfolgte automatisch (Casy Model TT Zellzähler, Fa. Roche, Mannheim, D).

Die Radioaktivität wurde mit einem Gamma Counter (Wizard<sup>2®</sup>, Fa. PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim, D) gemessen. Western Blots wurden mit einer digitalen Kamera (Gel Logic 1500 Imaging System, Fa. Kodak, Rochester, USA) dokumentiert. Für die Fluoreszenzmikroskopie stand ein inverses Mikroskop (DMI4000B, Fa. Leica, Wetzlar, D) mit den entsprechenden Filtern zur Verfügung.

#### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Fa. ATCC, Manassas, USA:	Zellkulturmedium RPMI-1640 und Hams F-12
Fa. GBO, Frickenhausen, D:	Cellstar <sup>®</sup> Cell Culture Flask; Cellstar <sup>®</sup> Einwegpipetten;
Fa. Gibco <sup>®</sup> lifetechnologies <sup>TM</sup> , SA:	Fetales Kälberserum, Penicillin (10000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)
Fa. Nunc <sup>TM</sup> , Roskilde, DK:	Cryo Tubes 1,8 ml
Fa. Thermo Scientific, Waltham, USA:	ChamberSlide <sup>®</sup>
Fa. TPP <sup>®</sup> , Trasadingen, CH:	Zellkulturplatten
Fa. Whatman <sup>TM</sup> , Buckinghamshire, UK:	PVDF-Membran, Gelblottingfilterpapier (GB003)

#### Chemikalien

Fa. AppliChem, Darmstadt, D:	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)
Fa. DAKO, Hamburg, D:	AK-Diluent DAKO S3022, Fluorescent Mounting Medium DAKO S3023; Proteinblock DAKO X0909



Fa. Merk, Darmstadt, D:	6-Aminohexansäure; 1,4-Dithiolthreitol (DTT)
Fa. Roche:	Casy <sup>®</sup> clean, Casy <sup>®</sup> ton
Fa. Roth, Karlsruhe, D:	Roti <sup>®</sup> Quant 5xKonzentrat
Fa. Serva, Heidelberg, D:	Acrylamid – Lsg. (40% w/v); Ammonium persulfat p.a.; Bromphenolblau; Sodiumdodecylsulfat (SDS); <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylen-1,2-diamin (TEMED), Tween-20
Fa. Sigma-Aldrich, St. Louise, USA:	RIPA-Puffer;
Fa. Thermo Scientific, Rockford, USA:	Super Signal west Femto Kit; SuperSignal <sup>®</sup> Molecular Weight Protein Ladder

Alle übrigen Chemikalien hatten mindestens p.A.-Qualität und wurden in der Regel von der Firma Roth, Karlsruhe, bezogen.

### 3.1.3 Radiopharmaka

Nuklearmedizin Universitätsmedizin Rostock      Ga<sup>68</sup>-PSMA

#### Herstellung von <sup>68</sup>Ga-PSMA

Das Radionuklid Gallium-68 wird aus dem ebenfalls radioaktiven Nuklid Germanium-68 in einem <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Generator gewonnen. Hierbei zerfällt das deutlich langlebige <sup>68</sup>Germanium spontan in <sup>68</sup>Gallium, welches dann aus einer Trägermatrix mit Hilfe eines Elutionsmittel eluiert werden kann. Im zweiten Schritt wird das gewonnen <sup>68</sup>Ga an das Glu-Urea-Lys Motiv des kommerziell erworbenen „small-molecule“ (Fa. ABX, D) gekoppelt.

### 3.1.4 Medikamente, Hemmstoffe und Antikörper

#### Medikamente

Zentralapotheke der Universitäts-  
medizin Rostock      Docetaxel

### Hemmstoffe

Fa. Tocris, Bristol, UK

2-(Phosphonomethyl)pentan-1,5-dicarbonsäure  
(PMPA)

### Antikörper

Fa. Abcam, Cambridge, UK

Monoklonaler Maus-anti-human PSMA-Anti-  
körper (Clon YPSMA-1, Subklasse IgG)

Fa. Abcam, Cambridge, UK

Polyklonales Kaninchen-anti-beta-Aktin Anti-  
serum (ab8227)

Fa. Abcam, Cambridge, UK

Dylight 488 konjugierter Esel-Anti-Maus  
Antikörper (ab96875)

Fa. Dionova

Peroxidase-konjugierter Esel-anti-Maus IgG  
Antikörper

Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG  
Antikörper

Fa. Exbio, Prag, CZ

Monoklonaler Maus-anti-human PSMA Anti-  
körper (Clon GCP04, Subklasse IgG)

### 3.1.5 Puffer und Medien

#### *3.1.5.1 Puffer für die Gelelektrophorese und den Western Blot*

Trenngel-Puffer:

1,5 M Tris mit HCl auf pH 8,8 eingestellt

Sammelgel-Puffer:

0,5 M Tris mit HCl auf pH 6,8 eingestellt

Probenpuffer (2x):

2,5 ml 0,5M Tris/HCl; 1,15ml Glycin; 5,0 ml H<sub>2</sub>O;  
10-20 Tropfen Bromphenolblau (1% in 96%  
Ethanol); 100 mg SDS; 15 mg DTT

Laufpuffer (10x):

0,25M Tris, 2M Glycin (pH 8,3)

Anodenpuffer 1:

300 mM Tris (pH 10,4); 20% Ethanol

Anodenpuffer 2:

30 mM Tris (pH 10,4); 20% Ethanol

Kathodenpuffer:

40 mM 6-Aminohexansäure; 25 mM Tris (pH 9,4);  
20% Ethanol

Towbin-Puffer (Transfer-Puffer):	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Ethanol; pH 8,3
TTBS (5x):	0,1 M Tris; 1,5 M NaCl; 0,25% Tween-20; mit HCl auf pH 7,5 eingestellt
TBS(5x):	0,1 M Tris; 1,5 M NaCl; mit HCl auf pH 7,5 eingestellt
Tris/HCl:	50 mM Tris mit HCl pH 7,5 eingestellt
BLOTTO 2% und 5%:	Magermilchpulver in TBS gelöst

### 3.1.5.2 Medien für die Zellkultur und Puffer zur Bestimmung des $^{68}\text{Ga}$ -Uptake in-vitro

Versuchspuffer:	25 mM TRIS; 140 mM NaCl; 5 mM Glukose; 5,4 mM KCL; 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,4
Einfriermedium:	10% DMSO in FCS
Medium für LNCaP-Zellen:	RPMI-1640 Medium mit 10% FCS, 100 U/l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin
Medium für PC3-Zellen:	Hams F-12 Medium mit 10% FCS, 100 U/l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin

### 3.1.6 Software

Alle Daten wurden primär in Microsoft Excel (Fa. Microsoft, Redmond, USA) gespeichert und mit den Statistikprogrammen Origin 6.0 und Sigma Plot 10.0 ausgewertet.

Für die schriftliche Ausarbeitung wurde Microsoft Word Version 2013 und Citavi 5 verwendet.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultivierung

Die Prostatakarzinomzelllinien PC3 und LNCaP stammten von der Firma ATCC, Manassas, USA. Für diese Arbeit wurden die Zellen zunächst über 5 Passagen in Kulturmedium (RPMI-

1640 mit 10% FCS für LNCaP-Zellen bzw. Hams F-12 mit 10% FCS für PC3-Zellen jeweils mit 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin) expandiert. Überschüssige Zellen wurden unter kontrollierten Bedingungen in Einfriermedium eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Alle Experimente wurden mit Zellen der Passagen 5 bis 40 durchgeführt.

Da andere Arbeiten gezeigt haben, dass ausreichend Androgene für das Wachstum von LNCaP im fetalem Kälberserum vorhanden sind, erfolgte kein weiterer Androgenzusatz (Müller 2008).

#### *3.2.1.1 Auftauen und Passagieren der Tumorzellen*

Kryokonservierte Zellen wurden bei 37° Celsius im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in eine mit Medium vorbereitete Kulturschale überführt.

Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um zytotoxische Rückstände des Einfriermedium zu entfernen.

Sobald der Zellrasen eine Konfluenz von 80-90% erreicht hatte, wurden die Zellen passagiert. Das Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die Zellen mit PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen und durch Zusatz von Trypsin (1 ml /100 mm Durchmesser der Kulturschale) solubilisiert. PC3-Zellen wurden mit der Trypsinierungslösung 3 Minuten im Brutschrank inkubiert, bei LNCaP-Zellen erfolgte die Trypsinierung bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von jeweils 10 ml vollständigem Medium gestoppt und die Zellen wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vollständig von der Schale gelöst. Die Zellsuspension wurde in Falconröhrchen überführt, die Zellen durch Zentrifugation (1200 rpm, 4°C, 4 min) pelletiert, in 10 ml frischem Medium aufgenommen und auf 3-6 Platten (PC3) bzw. 2-3 Platten (LNCaP) gleichmäßig ausgesät.

#### *3.2.1.2 Einfrieren der Tumorzellen*

Überschüssige Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Konfluente Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet, pelletiert, in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und im Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container bei -80°C eingefroren. Vollständig gefrorene Zellen wurden für die Langzeitkonservierung in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 3.2.1.3 *Bestimmung der Zellzahl*

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte aus jeweils 50 µl in 10 ml Casy<sup>®</sup>ton suspendierter Zellsuspension automatisiert und mit Zelllinien-spezifischen Programmen an einem Casy-Zellcounter. In diesem Gerät treten die Zellen durch eine Messpore hindurch, an der eine Spannung angelegt ist. Intakte Zellmembranen schirmen den Stromfluss ab und generieren somit ein Signal, das auch von der Größe der Zelle abhängig ist. Tote Zellen mit defekter Zellmembran können den Stromfluss nicht mehr ausschließen und werden mit der Größe des Zellkerns erfasst. Anhand der Größe erfolgt eine Differenzierung in vitale Zellen, tote Zellen und Zelldetritus.

Pro Zellsuspension wurde die Bestimmung fünfmal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Aufgrund der Ergebnisse konnten für alle Untersuchungen definierte Zellzahlen vorgegeben/verwendet werden.

#### 3.2.1.4 *Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeiten*

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden je 18 Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) für LNCaP und PC3 mit je 6 ml vollständigem RPMI-Medium bzw. Hams F-12 Medium vorbereitet. Die Zellen wurden in einer Dichte von jeweils  $2,5 \cdot 10^4$ ,  $5 \cdot 10^4$  und  $7,5 \cdot 10^4$  Zellen pro Flasche ausgesät und die Zellzahl alle zwei bis vier Tage im Counter bestimmt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle vier bis fünf Tage.

### 3.2.2 Vorbereitung der Aufnahmeversuche

#### 3.2.2.1 *Bestimmung der Zellvitalität unter verschiedenen Kulturbedingungen*

PC3- und LNCaP- Zellen wurden in reinem PBS-Puffer, reinem Hams F-12 Medium (PC3) bzw. RPMI-1640 Medium (LNCaP) oder einem Versuchspuffer inkubiert. Nach 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 h wurden Aliquots zur automatischen Bestimmung der Zellzahl entnommen.

### 3.2.3 Bestimmung der Bindung von $^{68}\text{Ga}$ -PSMA

Die Bindung der Radiopharmaka durch LNCaP- und PC3-Zellen wurde in PBS-Puffer gemessen. Pro Probe wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen vorgelegt und zum Start des Experiments  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA sowie ggf. anderen Substanzen zugegeben und der Ansatz bei  $37^\circ\text{C}$  auf einem Schüttler inkubiert. Um die Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA zu beenden, wurden zu definierter Zeit je 200  $\mu\text{l}$  entnommen und in 1 ml eiskaltes PBS eingetragen. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus 5 Proben.

Die Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA wurde unter verschiedenen Bedingungen (eingesetzte Aktivität, Inkubationszeit, Zusatz von Inhibitoren) in LNCaP-Zellen untersucht.

Gleiche Zellzahlen wurden mit steigenden Mengen an  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA (0,125 MBq, 0,25 MBq, 0,5 MBq und 1,5 MBq pro Probe) inkubiert und nach 30 Minuten die gebundene Aktivität bestimmt.

Weiterhin wurden Zellen mit 0,5 MBq  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA inkubiert und der Uptake nach 0-90 min bestimmt.

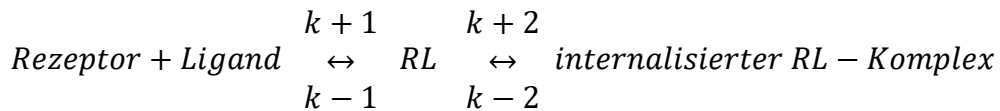
Die Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA wurde durch Zusatz von 2-PMPA inhibiert. (Baur et al. 2014).

Je  $1,4 \cdot 10^6$  Zellen wurden mit 3,5 MBq  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in Gegenwart steigender 2-PMPA Konzentrationen (10mM – 0,01 nM) inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 30 min) und der Uptake von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA im Gammacounter bestimmt.

#### 3.2.3.1 Michaelis-Menten Kinetik

Die Bestimmung der Aufnahmegeschwindigkeit von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in LNCaP Zellen erfolgte in Analogie zu der von Michaelis-Menten beschriebenen Kinetik enzymatischer Reaktionen. Die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) als langsamstem und somit geschwindigkeitsbestimmendem Prozess entspricht die Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA an membranständiges PSMA, dass der Internalisierung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA vorangeht.

Somit kann in Analogie zu der für eine enzymatische Reaktion geltenden Reaktionsgeschwindigkeit geschrieben werden:



Hierbei bildet der Rezeptor (R) mit dem Liganden (L) einen reversiblen RL-Komplex (RL), der in einer zweiten Teilreaktion internalisiert wird (internalisierter RL-Komplex). Dabei ist die Bildung des Rezeptor-Liganden-Komplex der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und in weiterer Analogie zu der von Michaelis-Menten entwickelten Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit  $V$  gilt:

$$V = V_{\max} \times \frac{[L]}{(K_M + [L])}$$

Hierbei beschreibt die Michaelis-Konstante  $K_M$  die Affinität von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA zu seinem Target und  $V_{\max}$  die maximale Geschwindigkeit der Internalisierung, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit als Veränderung der Substrat- oder Produktkonzentration pro Zeiteinheit definiert ist. In diesem System ist die Verfügbarkeit von PSMA auf der Zelloberfläche entscheidend und mit zunehmender Konzentration von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA bei konstanter Expression von PSMA wird sich die Reaktionsgeschwindigkeit asymptotisch einem Maximum annähern.

Je Ansatz wurden  $2 \cdot 10^6$  Zellen mit ansteigender Konzentration von naivem (= unmarkiertem oder kaltem) PSMA und einer konstanten Menge  $^{68}\text{Ga}$ -markiertem PSMA (5 MBq pro Ansatz) versetzt, das Volumen mit PBS-Puffer auf 2 ml ergänzt und der Ansatz unter leichtem Schütteln 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension entnommen, in das 5-fache Volumen eiskaltes PBS eingetragen, die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, 3x mit eiskaltem PBS gewaschen und die Radioaktivität bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass die Markierung des PSMA-bindenden Peptids die Affinität zwischen PSMA und der Target-Struktur nicht beeinflusst, konkurrieren beide Liganden um den Rezeptor und es ist zu erwarten, dass die internalisierte Menge an  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA mit steigender Konzentration des unmarkierten Liganden abnimmt.

Aus der Aktivität des eingesetzten  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA (Zerfälle/s) und der Zerfallskonstanten  $\lambda$  des  $^{68}\text{Ga}$  ( $1,706 \cdot 10^{-4}$  Zerfall/s) ergibt sich unter Berücksichtigung der Avogadrokonstanten ( $6,022 \cdot 10^{23}$  Teilchen/mol) die molare Konzentration des eingesetzten  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA

Weiterhin wurde die Proteinkonzentration pro Zellpellet nach Bradford bestimmt und aus diesen Angaben die auf den Proteingehalt bezogene und innerhalb von 30 min internalisierte Menge  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA berechnet.

Um die Ergebnisse mit den Angaben aus der Literatur zu vergleichen, wurden die Ergebnis auf ein Intervall von 10 Minuten korrigiert [nmol/mg Zellprotein / 10 min].

**Tab. 4** eingesetztes kaltes und heißes PSMA für Kompetition zur Aufnahme nach Michaelis-Menten

PSMA [nmol]	$^{68}\text{Ga}$ -PSMA [fmol]	Verhältnis kalt/heiß [nmol/fmol]
0	4,86	0
0,4	4,86	0,082
1	4,86	0,206
2	4,86	0,412
4	4,86	0,823
6	4,86	1,235
10	4,86	2,057
20	4,86	4,115
40	4,86	8,231
49,6	4,86	10,206

Mit diesen Daten konnten die Maximalgeschwindigkeit der  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA Aufnahme  $V_{\max}$  und die Michaeliskonstante  $K_M$  als spezifische Kenngrößen des Internalisierungsvorgangs bestimmt werden.



### 3.2.4 Nachweis des Prostata-spezifischen Membran-Antigens (PSMA) durch Western-Blot und Immunhistochemie

#### 3.2.4.1 Zellextraktion mit anschließender SDS-PAGE und Western Blot

LNCaP- und PC3-Zellen (80-90% Konfluenz) wurden zweimal vorsichtig mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem sterilen Zellschaber in 10 ml PBS vorsichtig von der Unterlage abgelöst, in ein Falconröhrchen überführt und schonend zentrifugiert (1200 rpm; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet durch Resuspension in 10 ml PBS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (1200 rpm; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet zur Lyse und Proteinextraktion mit 200 µl Ripa-Puffer sowie 10 µl Protease-Inhibitor-Cocktail 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der proteinhaltige Überstand wurde durch Zentrifugation (13000 rpm; 15 min; Raumtemperatur) vom Zelldebris getrennt, in ein neues Eppendorf-Hütchen überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

##### 3.2.4.1.1 Gelelektrophorese

Zur Durchführung des SDS-PAGE wurden jeweils ein unteres 10% Trenngel und ein oberes 5% Sammelgel gegossen.

Trenngel 10%: 1,9 ml Acrylamid – Lsg. (40% w/v), 3,6 ml H<sub>2</sub>O, 1,9 ml Trenngelpuffer, 100 µl 10% SDS, 100 µl 10% APS, 10 µl TEMED

Sammelgel 5%: 0,35 ml Acrylamid – Lsg. (40% w/v), 1,75 ml H<sub>2</sub>O, 0,6 ml Sammelgelpuffer, 25 µl 10% SDS, 25 µl 10% APS, 2,5 µl TEMED

Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel aufgegossen und ein Taschenkamm zur Ausformung der Probenaschen eingesetzt. Die Herstellung endete mit vollständiger Polymerisation beider Gele und Entfernung des Taschenkamms.

Das Gel wurde in der Gießform in die Elektrophoresekammer eingespannt, mit Laufpuffer übergossen und die Probenaschen durch Auf- und Abpipettieren von Laufpuffer zur Entfernung von Lufteinschlüssen und nicht-polymerisierten Acrylamidresten mehrfach gewaschen.

Als Molekulargewichtsmarker wurde ein Proteinstandard (SuperSignal® Molecular Weight Protein Ladder, Fa. Thermo Scientific) benutzt.

10 µl des vorbereiteten Proteinlysats wurden mit 10 µl Elektrodenpuffer gemischt, für 5 min bei 95° C inkubiert, auf Eis abgeschreckt und zentrifugiert (7000 rpm; 5 min; Raumtemperatur). Die SDS-PAGE erfolgte bei konstanter Stromstärke mit einer Elektrodenspannung von zunächst 80 mV. Nach Eintritt der Proben in das Trenngel wurde die Spannung auf 150 mV erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Front das Gelende erreicht hatte.

#### 3.2.4.1.2 *Blotting der Proteine*

Diskontinuierlicher Blot nach Kyhse/Andersen (Kyhse-Andersen 1984)

Für den Transfer der Banden auf die PVDF-Membran wurden Filterpapiere, PVDF-Membran und Polyacrylamidgel wie folgt vorbereitet und gestapelt.

1. Zwei Filterpapiere mit Anodenpuffer 1 getränkt
2. Ein Filterpapier mit Anodenpuffer 2 getränkt
3. PVDF-Membran mit Ethanol konditioniert und mit Anodenpuffer 2 equilibriert
4. Polyacrylamidgel mit Kathodenpuffer konditioniert (5-10 min)
5. Drei Filterpapiere mit Kathodenpuffer getränkt

Der Transfer im Semi-dry-Blotgerät (Fa. Trans-Blot, Semi-Dry Elektrophoretisch Transfer Cell, Bio-Rad, Richmond, USA) wurde bei einer Stromstärke von max. 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 45 min durchgeführt. Anschließend wurde die PVDF-Membran entnommen, mit H<sub>2</sub>O gespült und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5% Blotto (2 Stunden, Raumtemperatur) blockiert.

Danach wurde die Membran in 2% Blotto, dem die Primärantikörper in geeigneter Verdünnung zugefügt waren, für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgten Waschschrte (2x TTBS, 2xTBS für jeweils 5 min) zur Elimination ungebundener Antikörper sowie die Inkubation mit dem ebenfalls in 2% Blotto verdünnten Zweit-Antikörper (2 Stunden, Raumtemperatur) auf dem Schüttler. Die Membran wurde erneut gewaschen (2xTTBS, 2xTBS, 1xTris/HCL für je 5 min) und zur Visualisierung gebundener Antikörper eine Chemilumineszenz-Reaktion (Super Signal west Femto Kit, Fa. Pierce/Thermo) induziert. Nach 5 Minuten Inkubation im Dunkeln wurde der Blot fotografisch dokumentiert.

Die Positivkontrolle für LNCa- und PC3-Zelllysate erfolgte mit β-Aktin-Antikörpern.

**Tab. 5** Eingesetzte Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie

Antikörper	Isotyp	Hersteller	Zielstruktur	Quelle
<b>YPSMA-1</b>	IgG2b	Abcam (ab19071)	Extrazellulär (AS 716-723)	*1
<b>GCP-04</b>	IgG1	Exbio (11-532)	Extrazellulär (AS 100-104)	*2

\*1: (Tykvart et al. 2014; Schol et al. 2013; Wang et al. 2013; Mincheff et al. 2003; Mhawech-Fauceglia et al. 2007)

\*2: (Tykvart et al. 2014; Rovenská et al. 2008; Baiz et al. 2013; Barinka et al. 2004a; Barinka et al. 2004b; Sácha et al. 2007; Wang et al. 2011)

#### 3.2.4.2 Immunfluoreszenz

$5 \times 10^4$  Zellen wurden vorsichtig auf einen Objektträger zentrifugiert (Cellspin I Thamac, 1000 rpm, 10 min, RT), anschließend luftgetrocknet, in  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton für 10 min fixiert und erneut luftgetrocknet.

Die Präparate wurden dreimal in PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit einem „Proteinblock“ für 30 min blockiert. Der in Verdünnungsmedium (AK-Diluent) verdünnte Primärantikörper (YPSMA-1) wurde aufgetragen und bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit PBS entfernt und das Präparat mit einem Dylight 488-konjugierten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) und das Eindecken mit DAKO-Fluoreszenzmedium.

Zum Ausschluss falsch-positiver Reaktionen wurden weitere Präparate nur mit DAPI, bzw. dem Sekundärantikörper behandelt und ebenfalls in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt.

### 3.2.5 Behandlung der Zellen mit Docetaxel

#### 3.2.5.1 *Bestimmung der IC<sub>50</sub> von Docetaxel*

Für alle Experimente wurde eine Docetaxelstammlösung von 2 µg/ml verwendet.

Je  $2 \cdot 10^5$  Zellen wurden auf Zellkulturschalen (Ø 100 mm) mit 10 ml Medium ausgesät und für 24 Stunden (PC3) bzw. 48 Stunden (LNCaP) im Brutschrank kultiviert.

Nach dieser Zeit wurde das Medium durch Docetaxel-haltiges Medium ausgetauscht. Nach 5 Tagen wurde die Zahl der vitalen Zellen ermittelt und als Funktion der Docetaxelkonzentration im Medium zur Bestimmung der IC<sub>50</sub> aufgetragen.

#### 3.2.5.2 *<sup>68</sup>Ga-PSMA-Uptake-Messung in PC3- und LNCaP-Zellen nach Vorbehandlung mit Docetaxel*

Je  $1 \cdot 10^6$  Zellen wurden auf Kulturschalen (Ø 150 mm) ausgesät und für 24 Stunden (PC3) bzw. 48 Stunden (LNCaP) kultiviert. Nach dieser Zeit wurde in jeweils der Hälfte der Ansätze das Medium gegen Docetaxel-haltiges Medium (0,20 ng/ml für LNCaP- bzw. 0,8 ng/ml für PC3-Zellen) bzw. vollwertiges Kulturmedium getauscht.

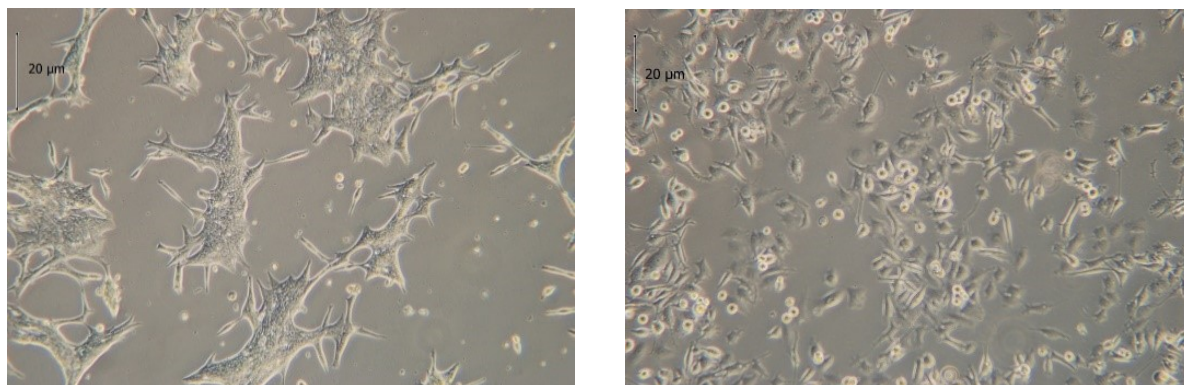
An den folgenden Tagen wurden je eine unbehandelte und eine behandelte Platte geerntet, die Zellzahl in einem Aliquot im Zellcounter bestimmt und die übrigen Platten mit 5 MBq <sup>68</sup>Ga-PSMA in einem Volumen von 2000 µl 30 min unter leichtem schütteln inkubiert.

Die <sup>68</sup>Ga-PSMA-Aufnahme wurde durch Transfer in eiskaltem PBS gestoppt, die Zellpellets in üblicher Weise dreimal gewaschen und die internalisierte <sup>68</sup>Ga-PSMA-Aktivität im Gamma-Counter bestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Morphologie, Proliferation und Wachstumsbedingungen der Zellen

PC3-Zellen fallen durch eine spindelförmige Form mit kleinen Zellkörpern auf, LNCaP-Zellen durch große Zellkörper mit dendritischen Ausläufern (Abb. 4-1).



**Abb. 4-1** Typisches Wuchsmuster von LNCaP-Zellen [links] und PC3-Zellen [rechts]

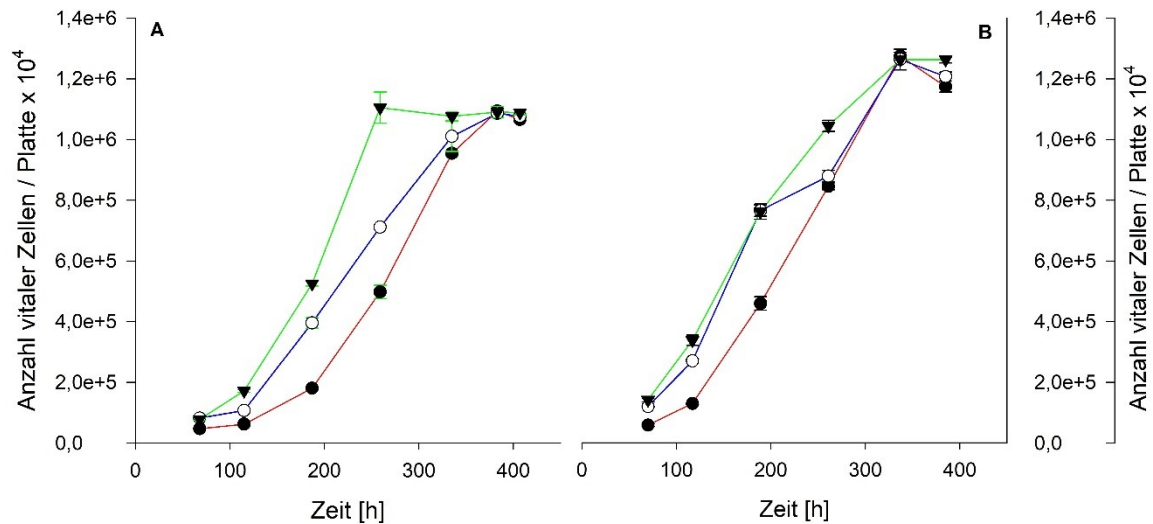
#### Morphologie

Der Zellcounter identifiziert anhand der Größe lebender Zellen ( $\geq 7,5 \mu\text{m}$ ), Zell-Fragmente ( $< 7,5 \mu\text{m}$ ) und Zelldebris und erlaubt zudem Aussagen über den mittleren Durchmesser und das mittlere Volumen der Zellen. Diese Daten sind in Tab. 6 angegeben.

**Tab. 6:** Kenngrößen von eingesetzten Zelllinien in Suspension

Zelllinie	Mittlerer Durchmesser	Mittleres Volumen
	[ $\mu\text{m}$ ]	[fl]
LNCaP	14,6	$3,9 \cdot 10^3$
PC3	16,3	$3,5 \cdot 10^3$

Alle Aufnahmeversuche mit  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA wurden mit Zellen aus dem exponentiellen Bereich des Zellwachstums durchgeführt. Um diesen zu ermitteln, wurde das Wachstumsverhalten über die Zeit ermittelt (Abb. 4-2).

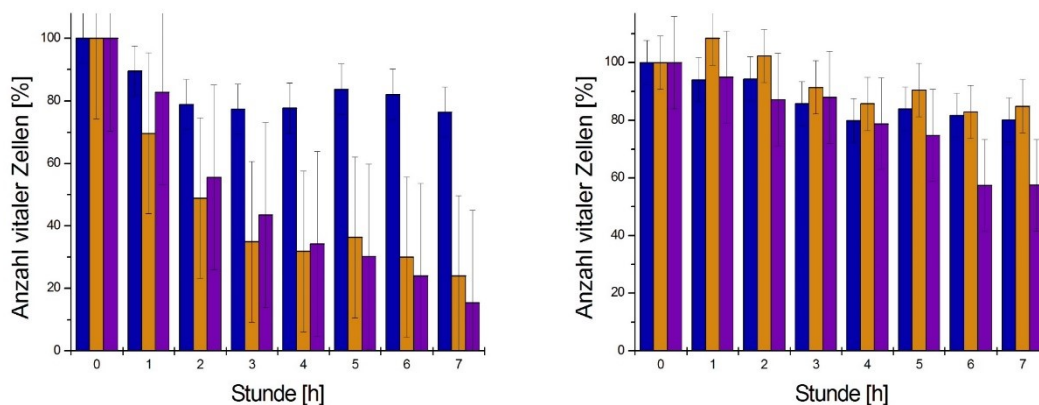


**Abb. 4-2** Wachstumskurven von LNCaP-Zellen (A) und PC3-Zellen (B). Graphen: rot 25000 Zellen, blau 50000 Zellen und grün 75000 Zellen

Die Plateauphase wurde bei den beiden untersuchten Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht, bei PC3 bei ca. 337 h, bei LNCaP nach ungefähr 335 h bzw. 383 h.

#### Überlebensrate bei verschiedenen Versuchsmedien/-Puffer

Es zeigte sich, dass PC3-Zellen sowohl in PBS als auch im Versuchspuffer ähnlich gut überleben können. Zwar scheint die Überlebensrate im Versuchspuffer in den ersten Stunden besser zu sein, nach 7 Stunden zeigte sich jedoch kein eindeutiger Überlebensvorteil (Überlebensrate nach 7 Stunden in PBS: 80%, Versuchspuffer: 84%). Jedoch zeigten PC3-Zellen im Hams F-12-Medium unter Versuchsbedingungen eine deutliche Reduktion des Überlebens (nach 7 Stunden: 57%).



**Abb. 4-3** Überlebensrate von LNCaP- (links) und PC3-Zellen (rechts) in Abhängigkeit vom Versuchsmedium. (blau= PBS; orange= Versuchspuffer; violett=RPMI-1640 Medium)

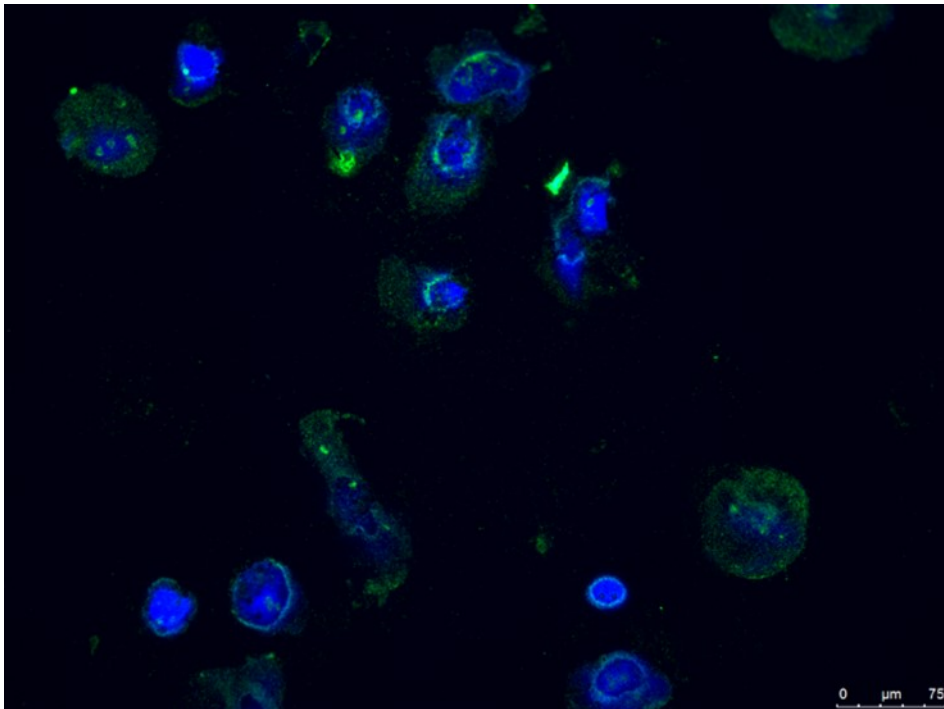
Bei LNCaP-Zellen zeigte sich ein deutlicher Vorteil von PBS in Vergleich zu einem Versuchspuffer und RPMI-Medium. Lag die Überlebensrate von LNCaP-Zellen in PBS ähnlich wie bei PC3 (nach 7 Stunden: 77%), fielen die Überlebensraten bei Versuchspuffer und RPMI-Medium deutlich ab (nach 7 Stunden: Versuchspuffer: 24%; RPMI-1640 Medium: 15%).

Auch in den ersten Stunden wurden bereits deutliche Unterschiede festgestellt.

Aufgrund der Ergebnisse und der Vorteile von PBS-Puffer beim Einsatz im Zell-Counter sowie der deutlich besseren Überlebensrate von LNCaP-Zellen bei fast gleicher Überlebensrate von PC3-Zellen im Vergleich zum Versuchspuffer wurde PBS als Aufnahmelösung für Uptakeversuche festgelegt.

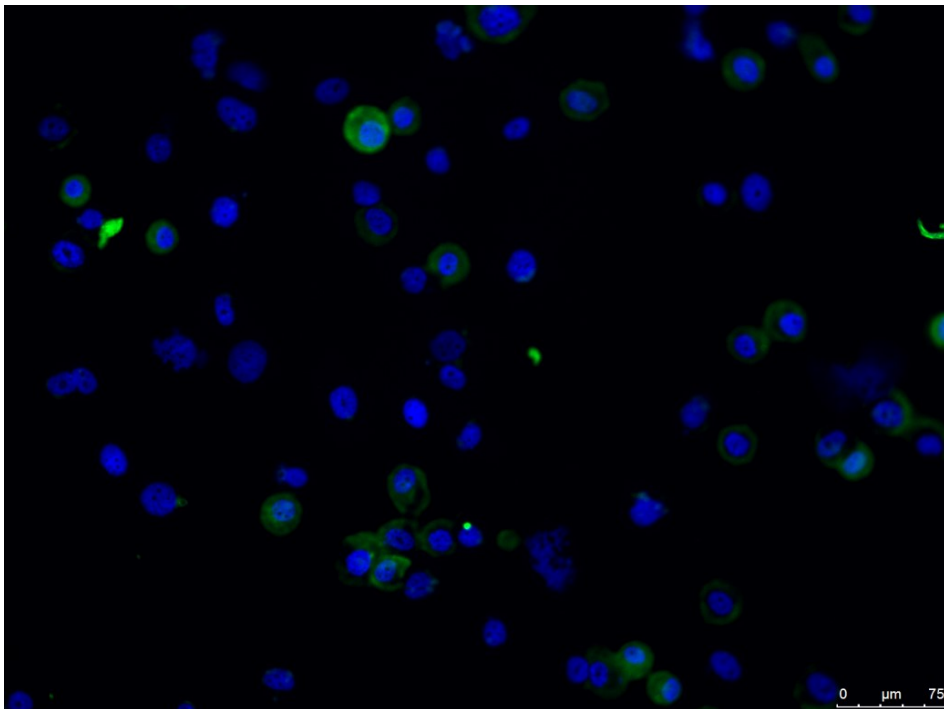
## 4.2 Nachweis von PSMA in LNCaP und PC3 Zellen durch Immunfluoreszenz und Westernblotting von Proteinlysaten

Die immunhistochemische Färbung nach Cytospin® zeigt zum einen in beiden Zelllinien durch DAPI-Kernfärbung blaue Zellkerne, die bei PC3 deutlich kleiner anmuten als bei LNCaP. Mit dem PSMA-spezifischen Antikörper YPSMA1 und dem 488 Dylight-konjugierten Sekundärantikörper ist in beiden Zelllinien ein deutliches Signal erkennbar.



**Abb. 4-4** Immunhistochemie: LNCaP Zellbild nach immunfloreszierender Färbung mit YPSMA1 und DAPI Kernfärbung am Cytospin®-Präparat

Während offensichtlich alle LNCaP-Zellen PSMA-positiv sind, ist dies bei PC3-Zellen nicht so eindeutig zu erkennen. Positive Signale in PC3-Zellen lassen sich als Epitope des PSMA-Membranproteins oder als Degradierungsprodukte erklären.

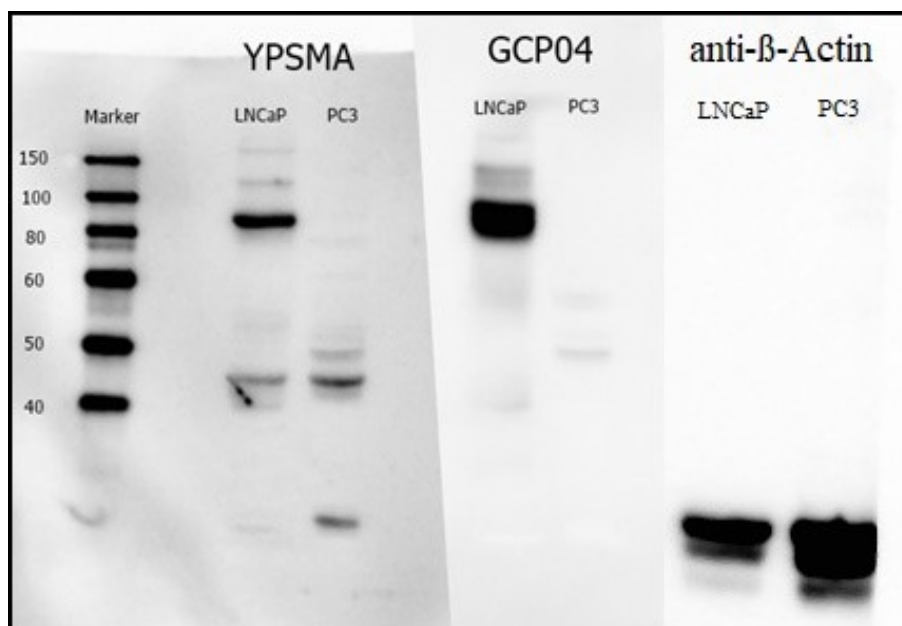


**Abb. 4-5** Immunhistochemie: PC3 Zellbild nach immunfloreszierender Färbung mit YPSMA1 und DAPI Kernfärbung am Cytospin®-Präparat



Auch im Western Blot bestätigt sich dieser Befund. Während in den Extrakten der LNCaP-Zellen PSMA mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern zu identifizieren ist, ist ein solcher Nachweis in PC3-Zellen nicht möglich (Abb. 4-7)

Die Ladekontrolle mit  $\beta$ -Actin bestätigt in beiden Fällen die erfolgreiche Proteinextraktion. Daher wurden alle weiteren Untersuchungen zur Internalisierung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA nur mit LNCaP-Zellen durchgeführt. Unter Verwendung des Antikörpers der Fa. Exbio zeigte sich eine Bande bei 95 kDa im LNCaP-Lysat, in der Kontrolle lediglich bei ca. 50 kDa.



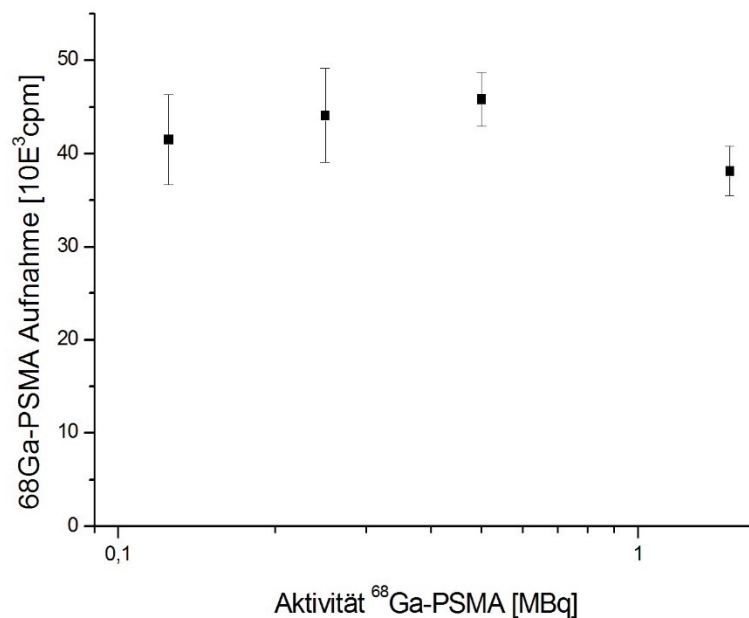
**Abb. 4-6** Western Blot: Nachweis von PSMA in LNCaP-Zellen (95-100 kDa-Bande gilt als positiver Nachweis), nicht jedoch in PC3-Zellen mittels zweier unterschiedlicher Primärantikörper (YPSMA1; GCP04) sowie positive Ladekontrolle für beide Zelllinien mit anti- $\beta$ -Actin.

### 4.3 Kinetik der $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Bindung in LNCaP-Zellen

#### 4.3.1 Dosis- und Zeitabhängigkeit der $^{68}\text{Ga}$ -PSMA Aufnahme

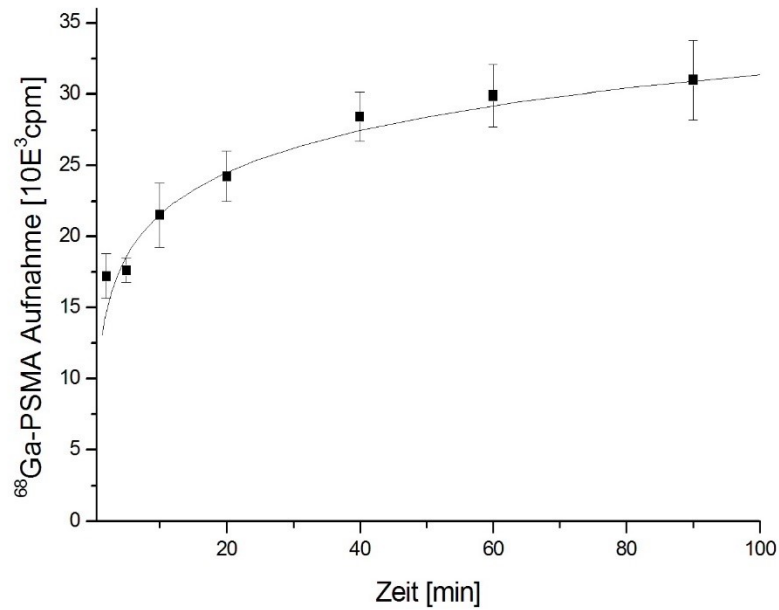
Zur Festlegung eines Standards wurden je Probe  $2 \cdot 10^5$  Zellen mit steigender Menge  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA inkubiert. Der höchste Uptake pro Probe zeigt sich bei 0,5 MBq, der niedrigste bei 1,5 MBq (Abb. 4-7).

Bezogen auf das bei 0,5 MBq beobachtete Maximum waren die bei 0,125, 0,25 und 1,5 MBq aufgenommenen Mengen um 4%, 9% und 17% geringer.



**Abb. 4-7** Uptake in cpm bei unterschiedlich eingesetzter Aktivität (0,125 MBq, 0,25 MBq, 0,5 MBq, 1,5 MBq). Der höchste Uptake wird bei 0,5 MBq erreicht.

Die Aufnahme von 0,5 MBq pro Probe in LNCaP-Zellen zeigt über die Zeit sich einem Plateau annähernden Anstieg, wobei in den ersten 5 Minuten ein sehr steiler Anstieg vorliegt und das Plateau nach circa 30 Minuten erreicht wird (Abb. 4-8).

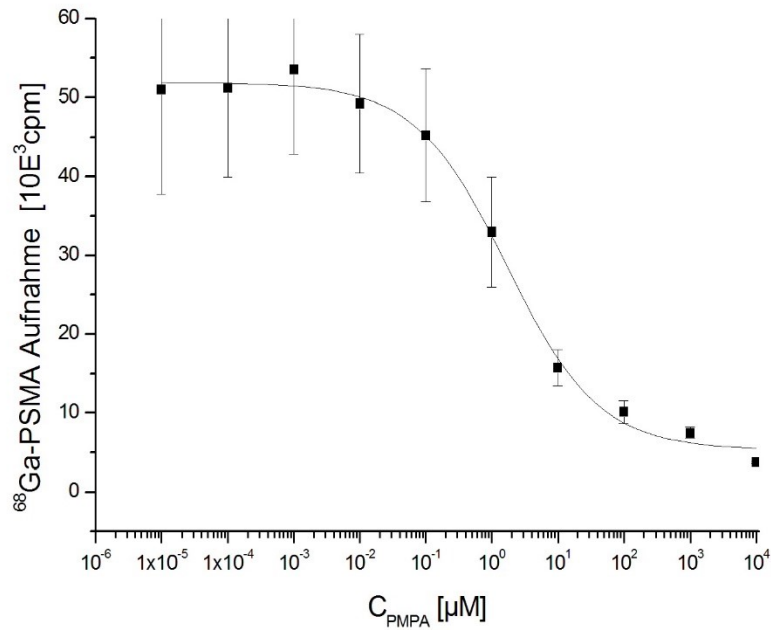


**Abb. 4-8** Darstellung des zeitabhängigen Uptakes von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in LNCaP-Zellen;

Aufnahmeversuche in PC3-Zellen zeigten über 90 Minuten keinen Uptake.

#### 4.3.2 Inhibierung mit PMPA

Die Aufnahme von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA wurde in Gegenwart von 0,01 nM bis 10 mM PMPA gemessen. Eine maximale Hemmung der  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Aufnahme wurde durch eine Konzentration von  $\geq 100 \mu\text{M}$  PMPA erreicht (Abb. 9).

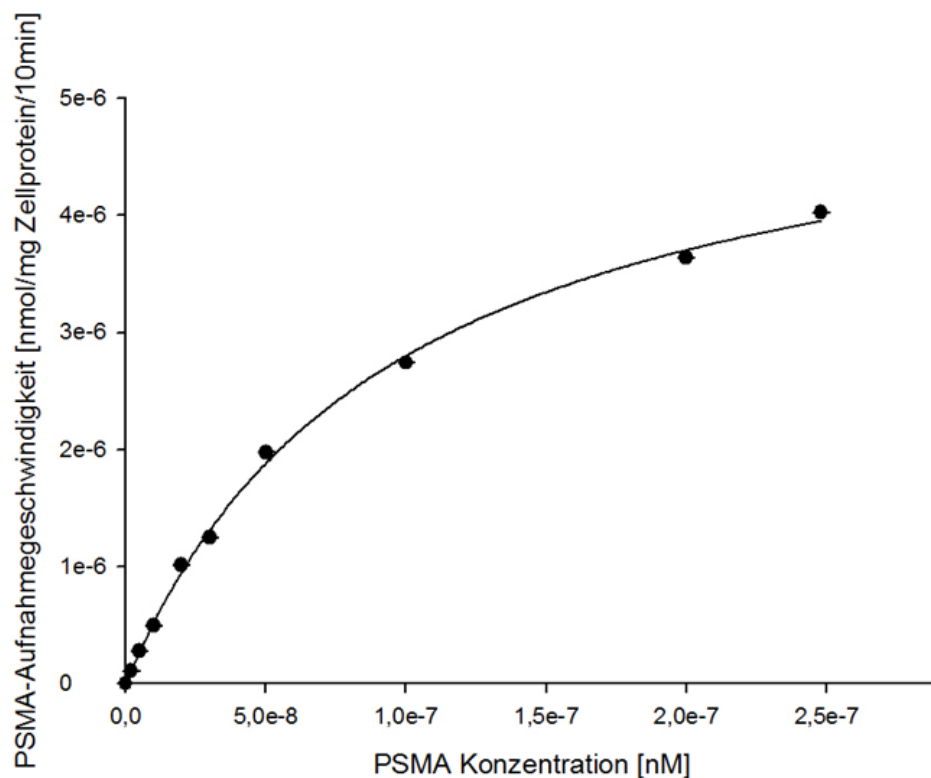


**Abb. 4-9** Konzentrationsabhängige Hemmung der  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA Aufnahme durch PMPA (100%= PMPA Konzentration von 0,01 nM bis 10 mM; logarithmische Darstellung der Abszisse); ermittelte  $\text{IC}_{50} = 1,72 \mu\text{M}$

Die Anpassung der Daten nach Hill lieferten als Wendepunkt und  $\text{IC}_{50}$ -Konzentration von PMPA einen Wert von  $1,72 \mu\text{M}$  PMPA.

#### 4.3.3 Bestimmung der Substrataffinität und Aufnahmegeschwindigkeit von $^{68}\text{Ga}$ -PSMA nach Michaelis-Menten

Die Aufnahmegeschwindigkeit von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in Gegenwart von kaltem PSMA zeigt einen hyperbolen Verlauf (Abb. 4-10). Aus der graphischen Darstellung der Daten wurden analog zur Enzymkinetik nach Michaelis-Menten ein  $K_D$ -Wert von 0,952 nM bzw. ein maximale Aufnahmegeschwindigkeit von  $5,4669\text{E-}6$  nmol/mg Zellprotein/10 min errechnet.

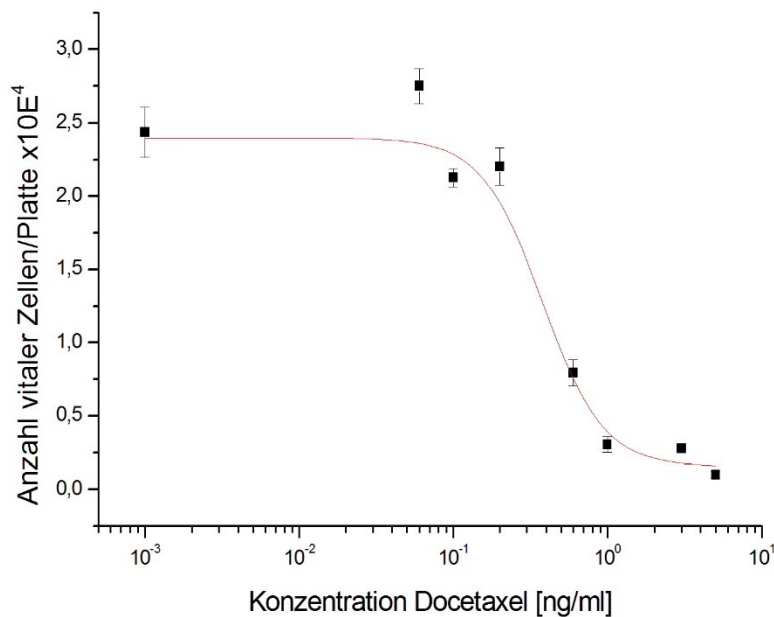


**Abb. 4-10** Michaelis-Menten-Kinetik der Aufnahme von PSMA in LNCaP-Zellen: Aufsteigende Konzentration an kaltem PSMA (0-248 nM) gegen die Aufnahmegeschwindigkeit (nmol/mg Zellprotein/10 min):  $V_{\text{MAX}}$ :  $5,4669\text{E-}6$ ;  $K_D$ :  $9,5157\text{E-}8$ ;

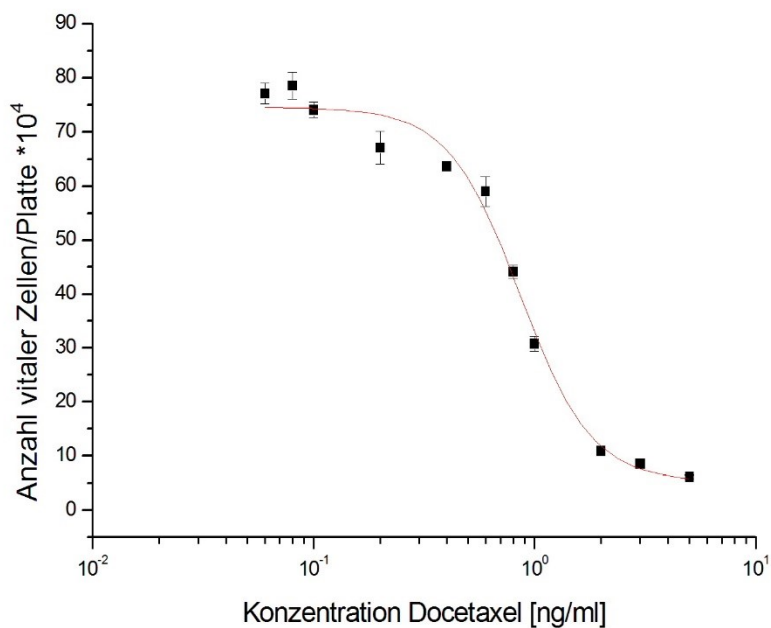
## 4.4 Behandlung mit Docetaxel

### 4.4.1 Bestimmung der $IC_{50}$

In beiden Zelllinien nimmt innerhalb von 5 Tagen die Zahl der vitalen Zellen während der Behandlung mit steigender Docetaxelmenge ab (Abb. 4-13 und 4-14).



**Abb. 4-11** Bestimmung der  $IC_{50}$  in LNCaP-Zellen: Bei steigender Dosis von Docetaxel zeigte sich eine deutliche Inhibition des Zellwachstums der Zellen.

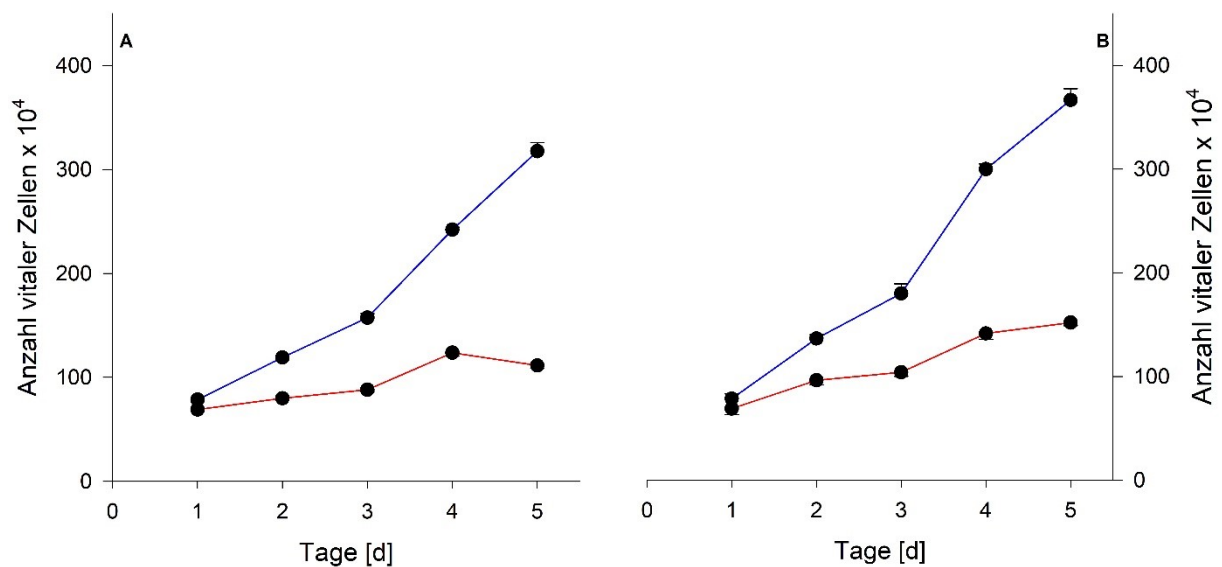


**Abb. 4-12** Bestimmung der  $IC_{50}$  in PC3-Zellen: Bei steigender Dosis von Docetaxel zeigte sich eine deutliche Inhibition des Zellwachstums der Zellen.

Die Behandlung beider Zelllinien mit Docetaxel zeigte für PC3 eine  $IC_{50} = 0,8 \text{ ng/ml}$  und für LNCaP eine  $IC_{50} = 0,2 \text{ ng/ml}$ . Die  $IC_{50}$  ist bei beiden Zelllinien auf eine Therapiedauer von 5 Tagen angelegt.

#### 4.4.2 Zellzahlentwicklung nach Therapie mit $IC_{50}$ über 5 Tage

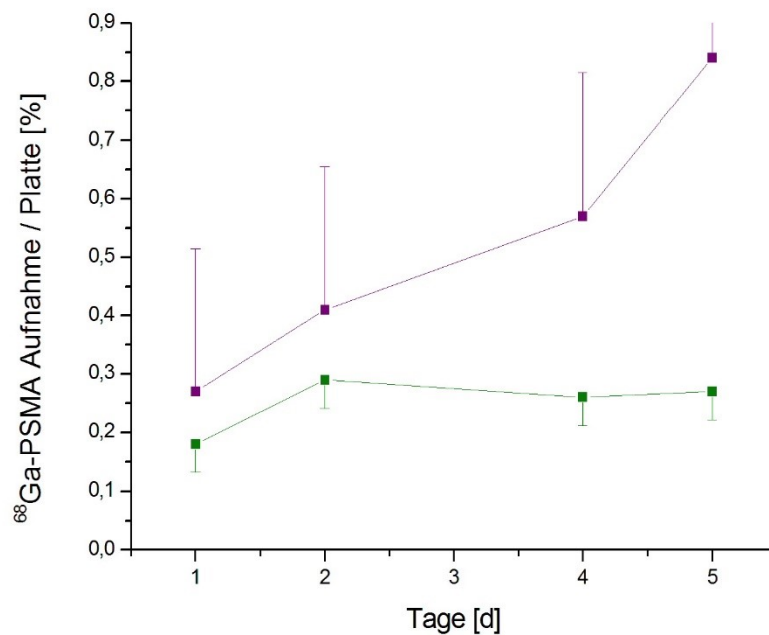
Therapierte LNCaP- ( $0,2 \text{ ng/ml}$  Docetaxel) und PC3-Zellen ( $0,8 \text{ ng/ml}$  Docetaxel) zeigten zwischen dem 4. und 5. Tag der Inkubation die Verdopplung der Zellpopulation bei deutlich schnellerem Wachstum der unbehandelten Kontrollgruppe. Weiterhin zeigt sich, dass PC3-Zellen in beiden Versuchsarmen ein stärkeres Wachstum haben als LNCaP-Zellen.



**Abb. 4-13** Zellzahlentwicklung nach Therapie mit Docetaxel (rot) und unbehandelten Zellen (blau) in LNCaP-Zellen (A) und PC3-Zellen (B)

#### 4.4.3 Aufnahme von $^{68}\text{Ga}$ -PSMA nach Docetaxelvorbehandlung

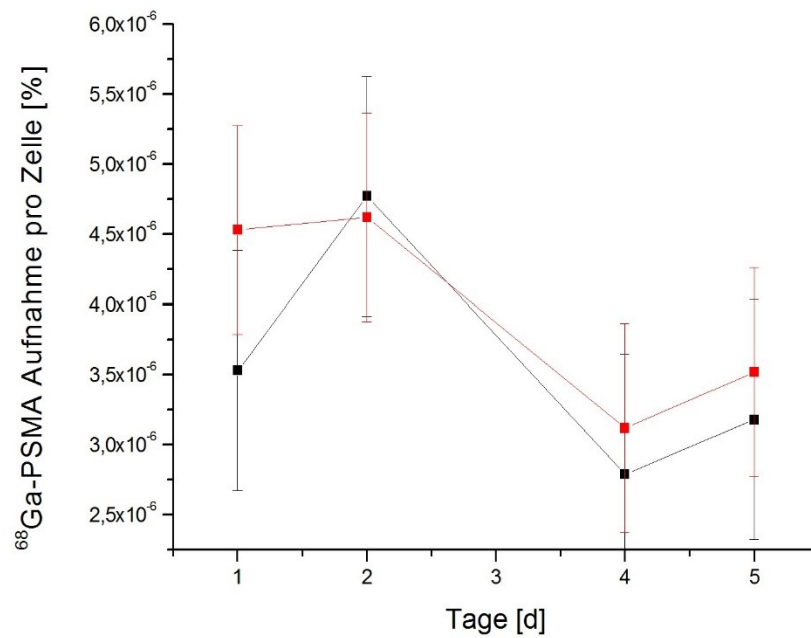
Weiterhin wurde untersucht, ob eine Docetaxeltherapie das Uptakeverhalten moduliert. Bei PSMA-positiven LNCaP-Zellen zeigte sich ein Anstieg des Uptakes pro Platte. Hiermit ist gemeint, dass eine Platte nach Docetaxeltherapie mit weniger Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe auch weniger Aktivität im Gammacounter zeigt.



**Abb. 4-44**  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA Aufnahme nach Co-Inkubation mit Docetaxel (grün) und unbehandelten (lila) LNCaP-Zellen



Betrachtet man den prozentualen Uptake pro Zelle, so erkennt man, dass beide Gruppen gleiche Menge an  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA aufnehmen.



**Abb. 4-15** Aufnahme von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA pro Zelle in mit Docetaxel behandelten (schwarz) und unbehandelten (rot) LNCaP-Zellen

PC3-Zellen haben weder in An- oder Abwesenheit von Docetaxel  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA aufgenommen.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass LNCaP-Zellen  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA binden, sodass eine Charakterisierung der eingesetzten Zelllinie unternommen wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in mit Docetaxel therapierten Zellen proportional zur Zellmasse im Sinne eines „cell-kills“ durch Docetaxel abnimmt.

Die Bindung pro Zelle wird durch eine zytotoxische Docetaxeltherapie jedoch nicht beeinflusst. Wie schon in anderen Arbeiten beschrieben, zeigen PC3-Zellen keine Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA und konnten somit als Negativkontrolle geführt werden.

Untersuchungen an kultivierten Tumorzellen dienten dazu, den Uptake von  $^{68}\text{Ga}$ -markierter PSMA-Liganden unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen. Die Erkenntnisse dieser Experimente sind insbesondere in Hinblick auf radioaktiv markierte Tracer und für die Interpretation von PET/CT-Bildern in der klinischen Routine von großer Relevanz (Haberkorn et al. 1994). Arbeiten zur FDG-Aufnahme in Tumorgewebe zeigten bereits, dass eine Chemotherapie den Uptake beeinflussen kann (Haberkorn et al. 1994). Ähnliche Ergebnisse konnten für den Uptake von Cholinderivaten gezeigt werden (Müller et al. 2009; Holzapfel et al. 2008).

Allerdings können die Verhältnisse in einem Tumor durch in-vitro Versuche nur zum Teil simuliert werden. Dafür sind u.a. unphysiologische Nährmedien und Zwischenzellabstände verantwortlich (Haberkorn et al. 1994).

Ein wichtiges Merkmal von Tumor-Zelllinien sind Proliferationsraten und Wachstumskurven. Für LNCaP-Zellen und PC3-Zellen konnten die bereits früher gezeigten (Müller 2008) triphasischen Verläufe mit Initialphase, exponentieller Wachstumsphase und Plateauphase bestätigt werden. Sowohl die visuelle Kontrolle als auch die automatische Bestimmung der Zellzahl bestätigen, dass die Zellen auch bei 80-90% Konfluenz noch exponentiell proliferieren und in dieser Phase für unsere Untersuchungen eingesetzt werden können.

Um realistische Daten zur Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA oder anderer Radiopharmazeutika zu erhalten, ist es wichtig, dass die Zellen während der Inkubation mit dem Tracer vital bleiben. Daher wurde der Einfluss verschiedener Nährmedien bzw. Puffer auf die Überlebensrate von LNCaP- und PC3-Zellen untersucht. Es zeigte sich ein deutlicher Vorteil von PBS gegenüber aus anderen Arbeitsgruppen verwendetem Versuchspuffern (Holzapfel et al. 2008; Müller et al.

2009). In reinem Nährmedium ohne FCS überlebten die Zellen ebenfalls schlechter. Denkbar ist, dass durch die Trypsinierung die Integrität der Zellmembran verloren geht, und/oder dass die Zellen im Laufe der Zeit langsam absterben.

Für die deutlich robusteren und somit in der Zellkultur einfacher zu handhabenden PC3-Zellen fielen lediglich graduelle Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Puffern und Medien auf.

## 5.1 Qualitativer und semiquantitativer Nachweis von PSMA als Zielstruktur für das $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Imaging

In LNCaP-Zellen wurde in Übereinstimmung mit der Literatur PSMA mit zwei gegen unterschiedliche Epitope des Proteins gerichteten monoklonalen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen (Tykvart et al. 2014).

Für die Antikörper YPSMA-1 (Schol et al. 2013; Wang et al. 2013) und GCP-04 (Rovenská et al. 2008; Baiz et al. 2013) zu erwartende Banden liegen bei 95-100 kDa (Tykvart et al. 2014). Beide Antikörper zeigten auch nach mehrmaligem Wiederholen wie auch nach Modifikation des Protokolls mehrere Banden im Western Blot.

Für den YPSMA-1 Antikörper zeigte sich in LNCaP-Zellen erwartungsgemäß eine Bande bei 95-100 kDa. Daneben waren weitere Banden bei 100 kDa, 150 kDa sowie 45 kDa zu erkennen. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den Banden von 100 kDa und 150 kDa um glykosylierte und/oder nicht vollständig entfaltete Formen des PSMA-Proteins handelt. Zudem ist anzunehmen, dass es sich bei den niedermolekularen Banden trotz Verwendung eines Proteaseinhibitorcocktails um Degradationsprodukte von PSMA handelt. Da in den für diese Frage relevanten Arbeiten (Baiz et al. 2013; Rovenská et al. 2008; Schol et al. 2013) nur Ausschnitte der Western Blots mit der postulierten Bande bei 95-100 kDa gezeigt werden, kann nicht ausgesagt werden, ob diese Banden spezifisch für die in dieser Arbeit eingesetzten LNCaP-Zellen bzw. unspezifisch sind. Im Extrakt der PC3-Zellen konnten lediglich Banden bei 45 kDa und 30 kDa nachgewiesen werden. Da diese Zellen  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA nicht internalisieren, ist somit zusätzlich gezeigt, dass diese Zelllinie PSMA-negativ ist.

Mit dem GCP-04 Antikörper werden die oben ausgeführten Befunde an LNCaP- und PC3-Zellen bestätigt.

Die Ladekontrolle mit  $\beta$ -Aktin belegt zweifelsfrei, dass von beiden Zelllinien ausreichende Mengen an Protein aufgetragen wurden, sowie, dass LNCaP-Zellen PSMA-positiv und PC3-Zellen PSMA-negativ sind.

Auch die Immunhistochemie mit dem PSMA-spezifischen Antikörper YPSMA-1 belegt, dass PC3-Zellen allenfalls vereinzelt PSMA exprimieren. In wie weit es sich hier tatsächlich um spezifische Reaktionen des Antikörpers handelt bleibt offen. Denkbar wäre eine unspezifische Bindung des PSMA-Antikörpers an Strukturen von Prostatakarzinomgewebe, u.a. auch vaskuläres Karzinomgewebe, welche durch andere Arbeitsgruppen in LNCaP-Zellen bereits beschrieben wurde (Liu et al. 1997, p. 3629). Western Blot und Immunhistochemie bestätigen ferner die fehlende Expression von PSMA in PC3-Zellen und zeigen eine membranständige Expression von PSMA in LNCaP-Zellen.

## 5.2 Kinetik des $^{68}\text{Ga}$ -PSMA - Uptakes

Weitere wichtige Faktoren des  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Uptakes sind neben der eingesetzten Aktivität auch die Bindungszeit, die ihrerseits durch die Halbwertszeit des  $^{68}\text{Ga}$  begrenzt ist. Nach fünf Halbwertszeiten bei der in den Versuchen eingesetzten Aktivitätsmenge, im Falle von  $^{68}\text{Ga}$  also nach 335 min ( $t_{1/2} = 67\text{min}$ ), ist praktisch keine Aktivität mehr nachweisbar. Dabei muss beachtet werden, dass die Aufbereitung der Proben für die Analyse im Gammacounter ebenfalls Zeit in Anspruch nimmt und eine späte Messung zu falsch niedrigen Zählraten führen kann. Um die Aufnahmereaktion zu stoppen, sind je nach Probenanzahl 2-5 min notwendig. Einerseits muss die Zeitspanne des Uptakes ausreichend lang gewählt werden, um den Fehler zwischen erster und letzter Probe gering zu halten, andererseits darf der insgesamt benötigte Zeitraum nicht wesentlich länger als eine Halbwertszeit sein. Die Aktivität darf aber auch nicht so hoch gewählt werden, dass die Totzeit des Detektors relevant wird und es dadurch ebenfalls zu falsch niedrigen Zählraten kommt.

Der  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Uptake war für Aktivitäten zwischen 0,125 MBq und 1,5 MBq vergleichbar. Dies lässt darauf schließen, dass bereits bei 0,125 MBq schon eine nahezu vollständige Sättigung erreicht ist. Ein minimal höherer Uptake wurde bei 0,5 MBq gemessen, so dass alle folgenden Untersuchungen mit dieser Aktivitätsmenge durchgeführt wurden.

Als idealer Inkubationszeit stellten sich 30 min heraus.

In Übereinstimmung mit anderen Studien wurde  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA von LNCaP, nicht aber von PC3-Zellen internalisiert (Baur et al. 2014; Wang et al. 2010; Eder et al. 2012).

Maximale Aufnahmegeschwindigkeit ( $V_{\text{MAX}}$ ) und Substrataffinität  $K_{\text{M}}$  sind wichtige Kenngrößen zur Charakterisierung von Radiopharmaka und in Zellkulturen. Es hat sich die Bestimmung dieser Kenngrößen in Analogie zur Enzymkinetik nach Michaelis-Menten bewährt.

Für LNCaP-Zellen wurde unter Verwendung des Radiopharmakons  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA<sup>HBED</sup> ein  $K_{\text{M}}$ -Wert von 0,95157 nM und ein  $V_{\text{MAX}}$ -Wert von  $5,4669 \cdot 10^6$  nmol/mg Zellprotein/10min bestimmt. Folgende Werte für unterschiedlich markierte PSMA-Antikörper finden sich in der Literatur:

- $^{68}\text{Ga}$ -markiertes CHX-A“DTPA-DUPA-Pep 14,67 nM (Baur et al. 2014)
- $^{18}\text{F}$ -markiertes PSMA<sup>HBED</sup> 10,3 nM (Malik et al. 2015, p. 777)
- $^{111}\text{In}$  markierter Antikörper gegen PSMA-Zielstruktur 1,76 nM (Smith-Jones et al. 2000, p. 5237)\*
- $^{111}\text{In}$  markierter Antikörper gegen PSMA-Zielstruktur 1,83 nM (Smith-Jones et al. 2000, p. 5237)\*
- $^{111}\text{In}$  markierter Antikörper gegen PSMA-Zielstruktur 6,69 nM (Smith-Jones et al. 2000, p. 5240)\*

\*Vergleich unterschiedlicher  $^{111}\text{In}$  markierter Antikörper gegen PSMA-Zielstruktur

Die Aufnahme von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in LNCaP-Zellen ist durch 2-PMPA dosisabhängig hemmbar. Unter den hier gewählten Bedingungen beträgt die  $\text{IC}_{50}$ -Konzentration 1,72  $\mu\text{M}$ .

Weiterhin konnte in Übereinstimmung mit Eder et al. und Maresca et al. gezeigt werden, dass 2-PMPA gegenüber PSMA<sup>HBED</sup> (Fa. ABX) als spezifischer Hemmstoff in LNCaP-Zellen funktioniert (Eder et al. 2012; Maresca et al. 2009) und somit eine Protektion von anderen PSMA expremierenden Geweben möglich erscheint.

Aktuell konnten keine weiteren  $\text{IC}_{50}$ -Werte für eine Hemmung mit 2-PMPA in der Literatur unter Verwendung von PSMA<sup>HBED</sup> gefunden werden. Ein Vergleich mit Radiopharmaka, die an anderen Aminosäuresequenzen des PSMA binden, ist ebenfalls nicht möglich, da 2-PMPA nicht bei jedem in der Forschung befindlichen Radiopharmakon eine Hemmung bewirkt (Eder et al. 2012).

Aktuelle klinische Studien beschäftigen sich mit einer möglichen Anwendung von 2-PMPA während einer radiopharmakologischen Therapie. Es konnte gezeigt werden, dass auch Nierengewebe in gewissem Ausmaß PSMA exprimiert, dieses aber im Vergleich zum Tumor nur in deutlich geringerer Konzentration (Kratochwil et al. 2015). Es wurde weiterhin dargestellt, dass kleine Dosen 2-PMPA die Aufnahme von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in die Nieren deutlich reduzieren ohne den Uptake im Karzinomgewebe zu beeinflussen (Kratochwil et al. 2015, p. 5). Weitere *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen von 2-PMPA und anderen Hemmstoffen (El-Zaria et al. 2014; Maresca et al. 2009) weisen darauf hin, dass die Dosis radioaktiver Strahlung auf benachbartes Gewebe in der nuklearmedizinischen Therapie reduziert werden kann, da es möglich ist benachbarte Strukturen mit PSMA-Oberflächenexpression durch den Zusatz dieses Inhibitors zu schützen.

### 5.3 Signalmodulation von $^{68}\text{Ga}$ -PSMA nach Docetaxeltherapie

Für  $^{11}\text{C}$ -Cholin konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit Docetaxel und Bicalutamid den Uptake von Cholinderivaten in einem Zeitfenster bis maximal 240 min nach Inkubation signifikant steigert (Müller et al. 2009, p. 1441). Im Mausmodell wurde mit  $^{18}\text{F}$ -Cholinderivaten bereits gezeigt, dass sich der Uptake mit einer ersten Messung nach frühestens einer Woche während einer erfolgreichen Docetaxeltherapie verringert, so dass eine Kontrolle des Therapieansprechens möglich ist (Schwarzenböck et al. 2013). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass PC3-Zellen nach einmaliger Bestrahlung mit 6 Gy innerhalb der ersten 24 h vermehrt, LNCaP-Zellen in den ersten 48 h nach Bestrahlung aber geringere Mengen Radiopharmazeutika aufnehmen (Holzapfel et al. 2008, p. 323). Effekte eines erhöhten Uptakes wurden auch in anderen Tumoren und mit  $^{18}\text{F}$ -FDG beobachtet (Haberkorn et al. 1994).

Auch in benignen Geweben können solche Modulationen vorkommen wie Schwarz et al. in seiner Arbeit bezüglich des Cholin-Uptakes in Makrophagen zeigt. Dies erschwert die Interpretation von Cholin-positiven Herden in der PET/CT (Schwarz et al. 2016). Es zeigte sich bereits, dass zwischen LNCaP-Zellen und Makrophagen bezüglich des Uptakes kein signifikanter Unterschied besteht (Schwarz et al. 2016). Somit kann nach einer  $^{18}\text{F}$ -Cholin-PET-Analyse nicht eindeutig zwischen inflammatorischen und kanzerogenen Prozessen unterschieden werden.

Aktuelle Arbeiten zu  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA als neues Radiopharmakon in der Diagnostik des Prostatakarzinoms sind noch selten. Kuroda et al. zeigte in seiner Arbeit, dass PSMA als Zielstruktur nach Docetaxeltherapie in gleichem Ausmaß wie in untherapierten Zellen an der Zelloberfläche exprimiert wird (Kuroda et al. 2009). Arbeiten zum Bindungsverhalten von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA *in-vitro* konnten aktuell nicht gefunden werden.

Es existieren viele Möglichkeiten zur Therapie des Prostatakarzinoms einschließlich multimodaler Therapiekonzepte. Multimodale Behandlungskonzepte bedeuten häufig die Kombinationen aus Chemotherapie, Bestrahlung und/oder Antihormontherapie. Daher ist es wichtig ein Ansprechen auf die Therapie zu untersuchen. Der Einsatz von Cholinderivaten zur *Responseevaluation* wurde bereits in anderen Arbeiten (Müller et al. 2009; Holzapfel et al. 2008) in Betracht gezogen.

Tracer wie  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA, das spezifisch an Prostatakarzinomgewebe bindet, bieten vor allem in der Darstellung suspekter Läsionen bei niedrigen PSA-Levels einen deutlichen Vorteil gegenüber Cholinderivaten (Afshar-Oromieh et al. 2014).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen eine Abnahme des  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Uptakes proportional zur Zellzahl im Sinne eines „cell-kills“ nach Docetaxeltherapie, die stellvertretend für die Tumormasse stehen kann. Der  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-Uptake pro Zelle konnte jedoch durch Docetaxel nicht beeinflusst werden. Dieser Befund reproduziert das Ergebnis von Kuroda et al., der an LNCaP-Zellen im Western Blot zeigen konnte, dass Docetaxel keinen Einfluss auf die PSMA-Expression pro Zelle hat (Kuroda et al. 2009).

Somit kann aus den *in-vitro* Daten geschlossen werden, dass eine nach Docetaxeltherapie reduzierte Aufnahme von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA für einen Rückgang der Tumorzellzahl/Tumormasse und damit für einen positiven Effekt der Docetaxelbehandlung spricht ohne eine Modulation am Internalisierungsprozesses in LNCaP-Zellen zu bewirken.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Expression von PSMA, die Kinetik der Internalisierung und der Einfluss von Docetaxel auf die Internalisierung des Radiopharmazeutikums  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA an LNCaP- und PC3-Zellen *in-vitro* untersucht.

In LNCaP konnte PSMA mit zwei kommerziell verfügbaren Antikörpern im Western Blot und über Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. In PC3 war PSMA nicht nachweisbar und in Übereinstimmung mit diesem Befund haben PC3-Zellen  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA nicht aufgenommen.

Zur kinetischen Charakterisierung erfolgte die Hemmung mit 2-PMPA. Es konnte gezeigt werden, dass PMPA bei LNCaP-Zellen als spezifischer Hemmstoff eingesetzt werden kann. Dies bedeutet, dass die Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA spezifisch für unsere Zielstruktur ist. Weiterhin wurden kinetische Parameter nach Michaelis-Menten an LNCaP-Zellen bestimmt und bestätigen die in der Literatur publizierten Werte.

Letztendlich konnte nach Inkubation mit Docetaxel an LNCaP-Zellen nachgewiesen werden, dass ein Aufnahmeverhalten von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in LNCaP nicht durch eine Docetaxeltherapie beeinflusst wird. Das Aufnahmeverhalten verhält sich proportional zur Tumormasse, ein Anstieg der Aufnahme pro Zelle konnte nicht gesehen werden. Damit kann  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA für die Therapieverlaufskontrolle eingesetzt werden.



## 7 Thesen

Das Radiopharmakon  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA wird in LNCaP-Zellen aufgenommen, nicht aber in PC3-Zellen.

Eine Verlängerung der Inkubation von LNCaP-Zellen mit  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA bringt keinen wesentlichen höheren Uptake des Radiopharmakons in die Zelle.

Ein qualitativer und semiquantitativer Nachweis mittels Western Blot und Immunhistochemie zum Nachweis und zur Darstellung der Zielstruktur PSMA ist möglich.

Zur Inhibition der Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in LNCaP-Zellen ist 2-PMPA dosisabhängig geeignet.

Durch eine vorangegangene zytotoxische Inkubation mit Docetaxel wird die Zellzahl auf einer Mediumplatte im Sinne eines „cell kills“ reduziert und ist im Zellaufnahmeversuch nachweisbar.

Die Aufnahme des Radiopharmakons  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA in die einzelne die Therapie überlebende Zelle wird durch die Therapie mit dem Zytostatikum Docetaxel nicht beeinflusst, da die Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA an seine Zielstruktur unverändert bleibt.

## 8 Literaturverzeichnis

Afshar-Oromieh, A.; Kratochwil, C.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Kopka, K.; Haberkorn, U. (2015): Rezidivdiagnostik des Prostatakarzinoms mit PSMA-Liganden PET/CT und die initialen klinischen Erfahrungen mit der PSMA-basierten Radioligandentherapie. *Nuklearmediziner* 38 (02), 124–130. DOI: 10.1055/s-0035-1548769.

Afshar-Oromieh, A.; Malcher, A.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Linhart, H. G.; Hadaschik, B. A. et al. (2013): PET imaging with a [68Ga]gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. *EJNMMI* 40 (4), 486–495. DOI: 10.1007/s00259-012-2298-2.

Afshar-Oromieh, Ali; Zechmann, Christian M.; Malcher, Anna; Eder, Matthias; Eisenhut, Michael; Linhart, Heinz G. et al. (2014): Comparison of PET imaging with a (68)Ga-labelled PSMA ligand and (18)F-choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. *EJNMMI* 41 (1), 11–20. DOI: 10.1007/s00259-013-2525-5.

Albrecht, Susanne; Buchegger, Franz; Soloviev, Dmitri; Zaidi, Habib; Veas, Hansjoerg; Khan, Haleem G. et al. (2007): (11)C-acetate PET in the early evaluation of prostate cancer recurrence. *EJNMMI* 34 (2), 185–196. DOI: 10.1007/s00259-006-0163-x.

Antonarakis, E. S.; Armstrong, A. J. (2011): Evolving standards in the treatment of docetaxel-refractory castration-resistant prostate cancer. *Prost Ccancer Prostatic dise.* 14 (3), 192–205. DOI: 10.1038/pcan.2011.23.

Aragon-Ching, Jeanny B. (2012): Enzalutamide (formerly MDV3100) as a new therapeutic option for men with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Asian J. Androl.* 14 (6), 805–806. DOI: 10.1038/aja.2012.113.

Aragon-Ching, Jeanny B. (2015): Use of early chemotherapy for hormone-sensitive prostate cancer: time for CHAARTED. *Asian J. Androl.* DOI: 10.4103/1008-682X.164920.

Baiz, Daniele; Hassan, Sazzad; Choi, Young A.; Flores, Anabel; Karpova, Yelena; Yancey, Dana et al. (2013): Combination of the PI3K Inhibitor ZSTK474 with a PSMA-Targeted Immunotoxin Accelerates Apoptosis and Regression of Prostate Cancer. *Neoplasia* 15 (10), p. 1172. DOI: 10.1593/neo.13986.

Barinka, Cyril; Mlcochová, Petra; Sába, Pavel; Hilgert, Ivan; Majer, Pavel; Slusher, Barbara S. et al. (2004a): Amino acids at the N- and C-termini of human glutamate carboxypeptidase II

are required for enzymatic activity and proper folding. *Eur J Biochem / FEBS* 271 (13), 2782–2790. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04209.x.

Barinka, Cyril; Šácha, Pavel; Sklenář, Jan; Man, Petr; Bezouška, Karel; Slusher, Barbara S.; Konvalinka, Jan (2004b): Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity. *Protein Sci.* 13 (6), 1627–1635. DOI: 10.1110/ps.04622104.

Barren, Robert J.III; Homes, Eric H.; Boynton, Alton L.; Misrock, S. Leslie; Murphy, Gerald P. (1997): Monoclonal Antibody 7EII.C5 Staining of Viable LNCaP Cells. *Prostate* (30), 65–68.

Bartkowiak, D.; Bottke, D.; Wiegel, T. (2015): Die perkutane Strahlentherapie als primäre Option der Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms. *Nuklearmedizin* 38 (02), 83–88. DOI: 10.1055/s-0035-1550006.

Baum, R.; Kulkarni, H.; Volkmer, B.; Bohuslavizki, K.; Schuchardt, C.; Klette, I. et al. (2015): Theranostik des metastasierten Prostatakarzinoms mittels Lu-177 PSMA-Liganden in Kombination mit Ga-68 PSMA PET/CT. *Nuklearmedizin* 38 (02), 145–152. DOI: 10.1055/s-0035-1549991.

Baur, Benjamin; Solbach, Christoph; Andreolli, Elena; Winter, Gordon; Machulla, Hans-Jürgen; Reske, Sven N. (2014): Synthesis, Radiolabelling and In Vitro Characterization of the Gallium-68-, Yttrium-90- and Lutetium-177-Labelled PSMA Ligand, CHX-A"-DTPA-DUPA-Pep. *Pharmaceuticals (Basel)* 7 (5), 517–529. DOI: 10.3390/ph7050517.

Bill-Axelson, Anna; Holmberg, Lars; Garmo, Hans; Rider, Jennifer R.; Taari, Kimmo; Busch, Christer et al. (2014): Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer. *N. Engl. J Med.* 370 (10), 932–942. DOI: 10.1056/NEJMoA1311593.

Bouchelouche, Kirsten; Oehr, Peter (2008): Positron emission tomography and positron emission tomography/computerized tomography of urological malignancies: an update review. *J Urol.* 179 (1), 34–45. DOI: 10.1016/j.juro.2007.08.176.

Brock, Marko; Bodman, Christian von; Sommerer, Florian; Lötters, Björn; Klein, Tobias; Deix, Thomas et al. (2011): Comparison of real-time elastography with grey-scale ultrasonography for detection of organ-confined prostate cancer and extra capsular extension: a prospective analysis using whole mount sections after radical prostatectomy. *BJU Int.* 108 (8 Pt 2), E217-22. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2011.10209.x.

Chen, Xuan; Liu, Yue; Wu, Jian; Huang, Huarong; DU, Zhiyun; Zhang, Kun et al. (2016): Mechanistic Study of Inhibitory Effects of Atorvastatin and Docetaxel in Combination on Prostate Cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 13 (2), 151–160.

Chodak, G. W.; Thisted, R. A.; Gerber, G. S.; Johansson, J. E.; Adolfsson, J.; Jones, G. W. et al. (1994): Results of conservative management of clinically localized prostate cancer. *N. Engl. J Med.* 330 (4), 242–248. DOI: 10.1056/NEJM199401273300403.

Chung, Mun Su; Lee, Seung Hwan (2016): Current status of active surveillance in prostate cancer. *Investig Clin Urol* 57 (1), 14. DOI: 10.4111/icu.2016.57.1.14.

Dehdashti, Farrokh; Picus, Joel; Michalski, Jeff M.; Dence, Carmen S.; Siegel, Barry A.; Katzenellenbogen, John A.; Welch, Michael J. (2005): Positron tomographic assessment of androgen receptors in prostatic carcinoma. *EJNMMI* 32 (3), 344–350. DOI: 10.1007/s00259-005-1764-5.

Eder, Matthias; Schafer, Martin; Bauder-Wust, Ulrike; Hull, William-Edmund; Wangler, Carmen; Mier, Walter et al. (2012): 68Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjug Chem* 23 (4), 688–697. DOI: 10.1021/bc200279b.

Effert, P. J.; Bares, R.; Handt, S.; Wolff, J. M.; Büll, U.; Jakse, G. (1996): Metabolic imaging of untreated prostate cancer by positron emission tomography with 18fluorine-labeled deoxyglucose. *J Urol.* 155 (3), 994–998.

Eiber, M.; Rauscher, I.; Holzapfel, K.; Schwaiger, M.; Maurer, T. (2015): Bildgebende Diagnostik des primären Prostatakarzinoms. Aktueller Stand und neue Entwicklungen. *Nuklearmedizin* 38 (02), 99–108. DOI: 10.1055/s-0035-1545338.

El-Zaria, Mohamed E.; Genady, Afaf R.; Janzen, Nancy; Petlura, Christina I.; Beckford Vera, Denis R.; Valliant, John F. (2014): Preparation and evaluation of carborane-derived inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA). *Dalton Trans* 43 (13), 4950–4961. DOI: 10.1039/c3dt53189a.

Evangelista, L.; Zattoni, F.; Rossi, E.; Karnes, R. J.; Lowe, V. (2015): Early detection of prostate cancer relapse by biochemistry and diagnostic imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 59 (4), 359–373.

Evangelista, Laura; Briganti, Alberto; Fanti, Stefano; Joniau, Stephen; Reske, Sven; Schiavina, Riccardo et al. (2016): New Clinical Indications for 18F/11C-choline, New Tracers for Positron

Emission Tomography and a Promising Hybrid Device for Prostate Cancer Staging. A Systematic Review of the Literature. *Eur Urol*. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.01.029.

Fair, William R.; Israeli, Ron S.; Heston, Warren D.W. (1997): Prostate-Specific Membrane Antigen. *Prostate* (30), 140–148.

Fanti, S.; Nanni, C.; Ambrosini, V.; Gross, M. D.; Rubello, D.; Farsad, M. (2007): PET in genitourinary tract cancers. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 51 (3), 260–271.

Ferlay, J.; Parkin, D. M.; Steliarova-Foucher, E. (2008): Estimates of cancer incidence and mortality in Europe 2008. *EUR J Cancer* 2010, 765–781.

Fox, Josef J.; Schöder, Heiko; Larson, Steven M. (2012): Molecular imaging of prostate cancer. *Curr Opin Urol* 22 (4), 320–327. DOI: 10.1097/MOU.0b013e32835483d5.

Haberkorn, U.; Morr, I.; Oberdorfer, F.; Bellemann, M. E.; Blatter, J.; Altmann, A. et al. (1994): Fluorodeoxyglucose uptake in vitro: aspects of method and effects of treatment with gemcitabine. *J Nucl Med: official publication, Society of Nuclear Medicine* 35 (11), 1842–1850.

Haberkorn, U.; Reinhardt, M.; Strauss, L. G.; Oberdorfer, F.; Berger, M. R.; Altmann, A. et al. (1992): Metabolic design of combination therapy: use of enhanced fluorodeoxyglucose uptake caused by chemotherapy. *J Nucl Med: official publication, Society of Nuclear Medicine* 33 (11), 1981–1987.

Hara, Ryoei; Jo, Yoshimasa; Fujii, Tomohiro; Kondo, Norio; Yokoyama, Teruhiko; Miyaji, Yoshiyuki; Nagai, Atsushi (2008): Optimal approach for prostate cancer detection as initial biopsy: prospective randomized study comparing transperineal versus transrectal systematic 12-core biopsy. *Urology* 71 (2), 191–195. DOI: 10.1016/j.urology.2007.09.029.

Heck, M.; Gschwend, J.; Kübler, H. (2015): Aktuelle Systemtherapie des metastasierten Prostatakarzinoms. *Nuklearmedizin* 38 (02), 78–82. DOI: 10.1055/s-0035-1545337.

Heidenreich, Axel; Abrahamsson, Per-Anders; Artibani, Walter; Catto, James; Montorsi, Francesco; van Poppel, Hein et al. (2013): Early detection of prostate cancer: European Association of Urology recommendation. *Eur Urol*. 64 (3), 347–354. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.06.051.

Heidenreich, Axel; Bastian, Patrick J.; Bellmunt, Joaquim; Bolla, Michel; Joniau, Steven; van der Kwast, Theodor et al. (2014a): EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening,

diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol.* 65 (1), 124–137. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.09.046.

Heidenreich, Axel; Bastian, Patrick J.; Bellmunt, Joaquim; Bolla, Michel; Joniau, Steven; van der Kwast, Theodor et al. (2014b): EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol.* 65 (2), 467–479. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.11.002.

Holzapfel, Korbinian; Müller, Sebastian A.; Seidl, Christof; Grosu, Anca-Ligia; Schwaiger, Markus; Senekowitsch-Schmidtke, Reingard (2008): Effects of irradiation on the [Methyl-3H]choline uptake in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC3. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* 184 (6), 319–324. DOI: 10.1007/s00066-008-1799-1.

Hong, Hao; Zhang, Yin; Sun, Jiangtao; Cai, Weibo (2010): Positron emission tomography imaging of prostate cancer. *Amino acids* 39 (1), 1–27. DOI: 10.1007/s00726-009-0394-9.

Jadvar, Hossein (2013): Imaging evaluation of prostate cancer with 18F-fluorodeoxyglucose PET/CT. Utility and limitations. *EJNMMI* 40 Suppl 1. DOI: 10.1007/s00259-013-2361-7.

Jimenez-Bonilla, Julio; Quirce, Remedios; Banzo, Ignacio; Martinez-Rodriguez, Isabel; Carril, Jose Manuel (2015): 11C-Choline and 18F-FDG PET/CT in the Detection of Occult Prostate Cancer in the Context of a Paraneoplastic Syndrome. *Clin Nucl Med* 40 (8), 695–696. DOI: 10.1097/RLU.0000000000000826.

Kratochwil, Clemens; Giesel, Frederik L.; Leotta, Karin; Eder, Matthias; Hoppe-Tich, Torsten; Youssoufian, Hagop et al. (2015): PMPA for nephroprotection in PSMA-targeted radionuclide therapy of prostate cancer. *J Nucl Med: official publication, Society of Nuclear Medicine* 56 (2), 293–298. DOI: 10.2967/jnumed.114.147181.

Kuroda, Kenji; Liu, He; Kim, Sae; Guo, Ming; Navarro, Vincent; Bander, Neil H. (2009): Docetaxel down-regulates the expression of androgen receptor and prostate-specific antigen but not prostate-specific membrane antigen in prostate cancer cell lines. Implications for PSA surrogacy. *Prostate* 69 (14), 1579–1585. DOI: 10.1002/pros.21004.

Kyhse-Andersen, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10 (3-4), 203–209.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 5.0, 2018, AWMF Registernummer: 043/022OL, <http://leitlinienprogrammonkologie.de/Prostatakarzinom.58.0.html> (abgerufen am: 14.06.2018)

Leitzmann, Michael F.; Rohrmann, Sabine (2012): Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol* 4. DOI: 10.2147/CLEP.S16747.

Liepe, K. (2015): Radium-223 Chlorid zur Schmerztherapie bei ossärer Metastasierung des Prostatakarzinoms. *Nuklearmedizin* 38 (02), 131–137. DOI: 10.1055/s-0035-1548770.

Liu, H.; Moy, P.; Kim, S.; Xia, Y.; Rajasekaran, A.; Navarro, V. et al. (1997): Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium. *Cancer Res.* 57 (17), 3629–3634.

Malik, Noeen; Baur, Benjamin; Winter, Gordon; Reske, Sven N.; Beer, Ambros J.; Solbach, Christoph (2015): Radiofluorination of PSMA-HBED via Al(18)F(2+) Chelation and Biological Evaluations In Vitro. *Mol Imaging Biol : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 17 (6), 777–785. DOI: 10.1007/s11307-015-0844-6.

Marcus, D. M.; Goodman, M.; Jani, A. B.; Osunkoya, A. O.; Rossi, P. J. (2012): A comprehensive review of incidence and survival in patients with rare histological variants of prostate cancer in the United States from 1973 to 2008. *Prostate cancer prostatic dis.* 15 (3), 283–288. DOI: 10.1038/pcan.2012.4.

Maresca, K. P.; Hillier, S. M.; Femia, F. J.; Keith, D.; Barone, C.; Joyal, J. L. et al. (2009): A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA) as radiolabeled probes for targeting prostate cancer. *J. Med. Chem.* 52 (2), 347–357. DOI: 10.1021/jm800994j.

Meller, B.; Bremmer, F.; Sahlmann, C. O.; Hijazi, S.; Bouter, C.; Trojan, L. et al. (2015): Alterations in androgen deprivation enhanced prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate cancer cells as a target for diagnostics and therapy. *EJNMMI Res.* 5 (1), 1–11. DOI: 10.1186/s13550-015-0145-8.

Mhaweche-Fauceglia, P.; Zhang, S.; Terracciano, L.; Sauter, G.; Chadhuri, A.; Herrmann, F. R.; Penetrante, R. (2007): Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an

immunohistochemical study using multiple tumour tissue microarray technique. *Histopathology* 50 (4), 472–483. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2007.02635.x.

Mincheff, Milcho; Zoubak, Serguei; Altankova, Iskra; Tchakarov, Stoyan; Makogonenko, Yevgen; Botev, Chavdar et al. (2003): Human dendritic cells genetically engineered to express cytosolically retained fragment of prostate-specific membrane antigen prime cytotoxic T-cell responses to multiple epitopes. *Cancer Gene Ther* 10 (12), 907–917. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700647.

Montero, Alberto; Fossella, Frank; Hortobagyi, Gabriel; Valero, Vicente (2005): Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *The Lancet Oncol* 6 (4), 229–239. DOI: 10.1016/S1470-2045(05)70094-2.

Müller, Sebastian A.; Holzapfel, Korbinian; Seidl, Christof; Treiber, Uwe; Krause, Bernd J.; Senekowitsch-Schmidtke, Reingard (2009): Characterization of choline uptake in prostate cancer cells following bicalutamide and docetaxel treatment. *EJNMMI* 36 (9), 1434–1442. DOI: 10.1007/s00259-009-1117-x.

Müller, Sebastian Andreas (2008): Charakterisierung des Cholintransports in humane Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu Kolonkarzinomzellen und zur FDG-Aufnahme. Dissertation. Available online at <http://mediatum.ub.tum.de?id=633138>.

N. Mottet (Chair); J. Bellmunt; Patient Representative (E. Briers); M. Bolla; P. Cornford (Vice-Chair); M. De Santis et al. (2016): EAU-ESTRO-SIOG GUIDELINES ON PROSTATE CANCER.

Nanni, Cristina; Schiavina, Riccardo; Rubello, Domenico; Ambrosini, Valentina; Brunocilla, Eugenio; Martorana, Giuseppe; Fanti, Stefano (2013): The detection of disease relapse after radical treatment for prostate cancer: is anti-3-18F-FACBC PET/CT a promising option? *Nucl Med Commun* 34 (9), 831–833. DOI: 10.1097/MNM.0b013e3283636eaf.

Oehr, Peter; Bouchelouche, Kirsten (2007): Imaging of prostate cancer. *Curr Opin Oncol* 19 2007 (19), 259–264.

Parimi, Sunil; Chi, Kim N. (2016): Chemotherapy for metastatic castration-sensitive prostate cancer. *Int J. Urol.: official journal of the Japanese Urological Association*. DOI: 10.1111/iju.13148.

Robert Koch-Institut (Ed.): Krebs in Deutschland 2011/2012. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 10. Ausg. 2015: RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut).



Rørvik, J.; Halvorsen, O. J.; Servoll, E.; Haukaas, S. (1994): Transrectal ultrasonography to assess local extent of prostatic cancer before radical prostatectomy. *Br J Urol* 73 (1), 65–69.

Rovenská, Miroslava; Hlouchová, Klára; Sába, Pavel; Mlcochová, Petra; Horák, Vratislav; Zámečník, Josef et al. (2008): Tissue expression and enzymologic characterization of human prostate specific membrane antigen and its rat and pig orthologs. *Prostate* 68 (2), 171–182. DOI: 10.1002/pros.20676.

Sába, P.; Zámečník, J.; Barinka, C.; Hlouchová, K.; Vicha, A.; Mlcochová, P. et al. (2007): Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain. *Neuroscience* 144 (4), 1361–1372. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.10.022.

Sánchez-Chapado, Manuel; Olmedilla, Gabriel; Cabeza, Manuel; Donat, Emilio; Ruiz, Antonio (2003): Prevalence of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia in Caucasian Mediterranean males: an autopsy study. *Prostate* 54 (3), 238–247. DOI: 10.1002/pros.10177.

Schicha, Harald; Schober, Otmar; Dietlein, Markus (Eds.) (2007): Nuklearmedizin. Basiswissen und klinische Anwendung ; mit 66 Tabellen und 101 Kasuistiken. 6., überarb. und aktualisierte Aufl. Stuttgart: Schattauer.

Schiff, P. B.; Fant, J.; Horwitz, S. B. (1979): Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277 (5698), 665–667.

Schlemmer, H-P (2010): Multiparametrische MRT der Prostata: Methode zur Früherkennung des Prostatakarzinoms? *RöFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin* 182 (12), 1067–1075. DOI: 10.1055/s-0029-1245786.

Schol, D.; Fleron, M.; Greisch, J. F.; Jaeger, M.; Frenz, M.; Pauw, E. de; Pauw-Gillet, M. C. de (2013): Anti-PSMA antibody-coupled gold nanorods detection by optical and electron microscopies. *Micron* 50, 68–74. DOI: 10.1016/j.micron.2013.05.003.

Schröder, F. H.; Hugosson, J.; Roobol, M. J.; et al (2009): ERSPC Investigators Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N. Engl. J Med.* (360), 1320–1328.

Schwarz, Timo; Seidl, Christof; Schiemann, Matthias; Senekowitsch-Schmidtke, Reingard; Krause, Bernd Joachim (2016): Increased choline uptake in macrophages and prostate cancer cells does not allow for differentiation between benign and malignant prostate pathologies. *Nucl Med Biol.* DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2016.02.004.

Schwarzenbock, S.; Sachs, D.; Souvatzoglou, M.; Schuster, T.; Nawroth, R.; Weirich, G. et al. (2013): (1)(1)Ccholine as a pharmacodynamic marker for docetaxel therapy. Response

assessment in a LNCaP prostate cancer xenograft mouse model. *Nuklearmedizin* 52 (4), 141–147. DOI: 10.3413/Nukmed-0521-12-07.

Schwarzenbock, Sarah M.; Eiber, Matthias; Kundt, Gunther; Retz, Margitta; Sakretz, Monique; Kurth, Jens et al. (2016): Prospective evaluation of <sup>11</sup>CCholine PET/CT in therapy response assessment of standardized docetaxel first-line chemotherapy in patients with advanced castration refractory prostate cancer. *EJNMMI*. DOI: 10.1007/s00259-016-3439-9.

Schwarzenböck, S.; Sachs, D.; Souvatzoglou, M.; Schuster, T.; Nawroth, R.; Weirich, G. et al. (2013): Ansprechen auf eine Docetaxeltherapie im LNCaP-Prostatakarzinom-Xenograft-Mausmodell. Untersuchung mit der [<sup>11</sup>C]Cholin-Kleintier-PET/CT. *Nuklearmedizin* 52 (4), 141–147. DOI: 10.3413/Nukmed-0521-12-07.

Schwarzenböck, S.; Souvatzoglou, M.; Krause, B. J. (2012): Choline PET and PET/CT in Primary Diagnosis and Staging of Prostate Cancer. *Theranostics* 2 (3), 318–330. DOI: 10.7150/thno.4008.

Schwarzenböck, Sarah Marie; Gertz, Jana; Souvatzoglou, Michael; Kurth, Jens; Sachs, David; Nawroth, Roman et al. (2015): Comparison of [<sup>11</sup>C]choline ([<sup>11</sup>C]CHO) and S(+)-β-methyl-[<sup>11</sup>C]choline ([<sup>11</sup>C]SMC) as imaging probes for prostate cancer in a PC-3 prostate cancer xenograft model. *Mol Imaging Biol : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 17 (2), 248–256. DOI: 10.1007/s11307-014-0782-8.

Smith-Jones, P. M.; Vallabahajosula, S.; Goldsmith, S. J.; Navarro, V.; Hunter, C. J.; Bastidas, D.; Bander, N. H. (2000): In vitro characterization of radiolabeled monoclonal antibodies specific for the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.* 60 (18), 5237–5243.

Taoka, T.; Mayr, N. A.; Lee, H. J.; Yuh, W. T.; Simonson, T. M.; Rezai, K.; Berbaum, K. S. (2001): Factors influencing visualization of vertebral metastases on MR imaging versus bone scintigraphy. *AJR. Am J Roentgenol* 176 (6), 1525–1530. DOI: 10.2214/ajr.176.6.1761525.

Troyer, J. K.; Beckett, M. L.; Wright, G. L., JR. (1997): Location of prostate-specific membrane antigen in the LNCaP prostate carcinoma cell line. *Prostate* (30), 232–242.

Tykvar, J.; Navrátil, V.; Sedlák, F.; Corey, E.; Colombatti, M.; Fracasso, G. et al. (2014): Comparative analysis of monoclonal antibodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Prostate* 74 (16), 1674–1690. DOI: 10.1002/pros.22887.

van Asseldonk, Brandon; Black, Peter; Elterman, Dean S. (2016): Chemical vs Surgical ADT in Metastatic Prostate Cancer: A Comparison of Side Effects. Commentary on Comparison of Gonadotropin-releasing Hormone Agonists and Orchiectomy: Effects of Androgen Deprivation Therapy. *Urology* 93, 3–4. DOI: 10.1016/j.urology.2016.04.002.

Varma, Murali; Lee, Min W.; Tamboli, Pheroze; Zarbo, Richard J.; Jimenez, Rafael E.; Salles, Paulo G. O.; Amin, Mahul B. (2002): Morphologic criteria for the diagnosis of prostatic adenocarcinoma in needle biopsy specimens. A study of 250 consecutive cases in a routine surgical pathology practice. *Arch Pathol Lab Med* 126 (5), 554–561. DOI: 10.1043/0003-9985(2002)126<0554:MCFTDO>2.0.CO;2.

Verburg, Frederik A.; Pfister, David; Heidenreich, Axel; Vogg, Andreas; Drude, Natascha I.; Vöö, Stefan et al. (2015): Extent of disease in recurrent prostate cancer determined by [(68)Ga]PSMA-HBED-CC PET/CT in relation to PSA levels, PSA doubling time and Gleason score. *EJNMMI*. DOI: 10.1007/s00259-015-3240-1.

Walz, J.; Loch, T.; Salomon, G.; Wijkstra, H. (2013): Lokale Bildgebung der Prostata. *Urologe. Ausg. A* 52 (4), 490–496. DOI: 10.1007/s00120-012-3103-3.

Wang, Haofan; Byun, Youngjoo; Barinka, Cyril; Pullambhatla, Mrudula; Bhang, Hyo-Eun C.; Fox, James J. et al. (2010): Bioisosterism of urea-based GCPII inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem Lett* 20 (1), 392–397. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.10.061.

Wang, Luofu; Li, Lang; Guo, Yanli; Tong, Haipeng; Fan, Xiaozhou; Ding, Jun; Huang, Haiyun (2013): Construction and In Vitro/In Vivo Targeting of PSMA-Targeted Nanoscale Microbubbles in Prostate Cancer. *Prostate* 73 (11), 1147–1158. DOI: 10.1002/pros.22663.

Wang, X.; Ma, D.; Olson, W. C.; Heston, W. D. W. (2011): In Vitro and In Vivo Responses of Advanced Prostate Tumors to PSMA ADC, an Auristatin-Conjugated Antibody to Prostate-Specific Membrane Antigen. *Mol Cancer Ther* 10 (9), 1728–1739. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0191.

Weineisen, Martina; Simecek, Jakub; Schottelius, Margret; Schwaiger, Markus; Wester, Hans-Jürgen (2014): Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *EJNMMI Res*. 4 (1), 63. DOI: 10.1186/s13550-014-0063-1.

Weirich, G. (2015): Pathologie des Prostatakarzinoms. *Nuklearmedizin* 38 (02), 75–77. DOI: 10.1055/s-0035-1550005.

Wright, George L.; Mayer Grob, B.; Haley, Cara; Grossman, Katie; Newhall, Kathy; Petrylak, Daniel et al. (1996): Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. *Urology* 48 (2), 326–334. DOI: 10.1016/S0090-4295(96)00184-7.